

Dissertation

Ein 3D-Modell des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Kristian Falke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christian Spahn

2. Prof. Dr. Roland Beckmann

3. Prof. Dr. Holger Dobbek

eingereicht:

5. April 2012

Datum der Promotion:

28. September 2012

Zusammenfassung

Gleich einem Etikett dient die N-Glykokosylierung vom Ribosom neu synthetisierter Proteine durch die Oligosaccharyltransferase (OST) bei der kotranslationalen Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) als Startpunkt vielschichtiger Prozessierungen.

Bisher fehlte der strukturelle Nachweis, dass die OST als mit dem Ribosom assoziierten Membranprotein (RAMP) Bestandteil des auf dem proteinleitenden Kanal, dem Sec61-Komplex, basierenden Translokons ist.

In dieser Arbeit berichten wir von der kryoelektronenmikroskopischen 3D-Struktur eines definierten OST-Sec61-Ribosom-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* bei 15,4 Å Auflösung. Dazu wurden die Komponenten (OST, Sec61 und Ribosomen mit naszierender Proteinkette) affinitätschromatographisch gereinigt und das Bindungsverhalten mit 80S-Ribosomen *in vitro* untersucht. Die OST band mit einer K_D von 12,8 nM hochaffin und spezifisch an den bekannten Sec61-Ribosomen-Komplex.

Dieser *in vitro* rekonstituierte trimere Komplex zeigte eine neuartige eng an das Ribosom anschließende Translokonstruktur mit zwei bisher unbekannten ribosomalen Verbindungen, einer einzigen dezentralen porenförmigen Vertiefung und zusätzlichen luminalen Bereichen.

Durch das Docken eines Sec61-Homologs in einer alternativen Bindeposition sowie das Docken eines Stt3p-Homologs (der katalytischen Untereinheit der OST) und mit Hilfe der mittels (Kryo-)Negativkontrastierung gewonnenen 3D-Struktur der OST konnten Hybridmodelle erstellt werden.

Daraus wurde unter Einbeziehung von bekannten molekularbiologisch gewonnenen Interaktionsdaten das 3D-Modell eines aktiven Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons entwickelt.

Schlagworte:

Kryoelektronenmikroskopie, 3D, Hybrid-Modell, Ribosomen-assoziierte Membranproteine (RAMPs), Translokon, kotranslational, Sec61-Komplex, Oligosaccharyltransferase (OST)

Abstract

Like a label, N-glycosylation by the oligosaccharyltransferase (OST) of newly synthesized proteins emerging from the ribosome while being cotranslationally translocated into the endoplasmic reticulum (ER) provides a starting point for a multitude of processes.

Hitherto no structural proof has been presented, that the OST as a ribosome associated membrane protein (RAMP) is a constituent of the translocon, based at its core on the protein conducting channel (Sec61-complex).

In this work we report on the 3D-structure of a defined OST-Sec61-ribosome complex from *Saccharomyces cerevisiae* by cryo-electron microscopy at 15.4 Å resolution. Thereto, the components (OST, Sec61, ribosome nascent chain complexes) have been purified by affinity chromatography and the binding of 80S-ribosomes has been checked *in vitro*. The OST bound with high affinity by a K_D of 12.8 nM specifically to the established Sec61-ribosome complex.

This trimeric complex reconstituted *in vitro* exhibits a new kind of tightly bound ribosomal translocon showing two hitherto unknown connections to the ribosome, a single off-center pore-like indentation and an additional luminal domain.

By docking of a Sec61 homologue at an alternative binding position plus the docking of a Stt3p homologue (the catalytic subunit of the OST) and by means of the 3D-structure of the OST using the (cryo-)negative staining technique, hybrid models could be created.

Consequently, integrating known interaction data from molecular biology experiments has been used to develop a 3D-model of an active ribosome-bound OST-Sec61-translocon.

key words:

cryo-electron microscopy, 3D, hybrid model, ribosome associated membrane proteins (RAMPs), translocon, cotranslationally, Sec61-complex, oligosaccharyltransferase (OST)

*„Der Natur gegenüberzustehen und seinen Scharfsinn an ihren Rätseln zu erproben,
gibt dem Leben einen ungeahnten Inhalt.“ (Alfred Wegener)*

für A. bis Z.

Zusammenfassung	I
Abstract	II
für A. bis Z.	IV
Abkürzungen	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die kotranslationale Translokation	4
1.1.1 Der proteinleitende Kanal	9
1.1.2 Die Oligosaccharyltransferase	13
1.2 Elektronenmikroskopische 3D-Strukturaufklärung	19
1.2.1 Random Conical Tilt	21
1.2.2 Common Lines	23
1.2.3 Projection Matching	25
1.2.4 Modellentwicklung	26
1.3 Zielsetzung	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Präparation	29
2.1.1 Hefezüchtung und Stämme	29
2.1.2 S100 und Mikrosomengewinnung	29
2.1.3 Flotieren	30
2.1.4 Komigration Ribosomen-assoziiierter-Membranproteine (RAMPs)	30
2.1.5 Herstellen von IgG Sepharose	31
2.1.6 Präparation der Oligosaccharyltransferase (OST)	31
2.1.7 Sec61 Präparation	32
2.1.8 Ribosomenpräparation	33
2.1.9 Bindungstests	33

2.1.10	Proteinnachweis	34
2.1.11	mRNA Präparation	35
2.1.12	DNA und RNA Nachweis	35
2.1.13	Ribosomen mit naszierender Proteinkette	35
2.1.14	Gridvorbereitung	37
2.1.15	Negative Stain Grids	37
2.1.16	Kryo-Negative Stain Grids	37
2.1.17	Kryo Grids	37
2.1.18	Kontroll-TEM	38
2.1.19	TEM Aufnahme und Scannen	38
2.2	Datenprozessierung	39
2.2.1	Kryo-EM Einzelpartikel Rekonstruktion	39
2.2.2	Common Lines Rekonstruktion	40
2.2.3	Random Conical Tilt Rekonstruktion	40
2.2.4	Negative Stain Rekonstruktion	41
2.2.5	Visualisierung und Docking	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Ribosomen-assoziierte Membranproteine	42
3.2	Präparation und Charakterisierung	44
3.2.1	Die Oligosaccharyltransferase	44
3.2.2	Der Sec61-Komplex	45
3.2.3	80S Ribosomen und Ribosomen mit naszierender Proteinkette	46
3.2.4	Bindung und Sättigung	48
3.3	Struktur der Oligosaccharyltransferase	52
3.3.1	Homogenität und Kontrastierung	52
3.3.2	Random Conical Tilt Struktur	53

3.3.3	Common Lines Struktur	56
3.3.4	Gesamtstruktur	58
3.3.5	Molecular Docking	60
3.4	Struktur des OST-Sec61-Translokons	62
3.4.1	Struktur des OST-Sec61-RNC-Komplexes	62
3.4.2	Das am Ribosom gebundene OST-Sec61-Translokon	64
3.4.3	Das isolierte Ribosomen-gebundene OST-Sec61-Translokon	67
3.4.4	Hybridmodell des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons	73
4	Diskussion	75
4.1	Zur Präparation und Charakterisierung	76
4.2	Zu den 3D-Strukturen	77
4.2.1	Zur 3D-Struktur der Oligosaccharyltransferase	77
4.2.2	Zur 3D-Struktur des OST-Sec61-Ribosom-Komplexes	78
4.3	Zur Modellentwicklung	80
4.3.1	Zum proteinleitenden Kanal im Modell	80
4.3.2	Zur Oligosaccharyltransferase im Modell	81
4.3.3	Zur Koordination	82
4.3.4	Zu den Modelldetails	84
4.4	Ausblick	86
	Danksagung	87
	Literatur	88

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
80S	eukaryotische (Ribosomen)
A	Adenin
Å	Ångström: $1 \text{ Å} = 100 \text{ pm}$
Ac	Acetyl(gruppe)
A_λ	Absorption bei Wellenlänge $\lambda \text{ nm}$
BiP	Immunoglobulin-heavy-chain-binding protein
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
CL	Common Lines
CTF	Contrast Transfer Function
Cub	C-terminale Hälfte des Split-Ubiquitin
Da	Dalton
DP120	120 Nukleotide der DPAP
DPAP	Dipeptidylaminopeptidase B
dpi	Dots per Inch
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enzymatic Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEF	eukaryotischer Elongationsfaktor
EM	Elektronenmikroskop(ie)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES27	Expansionssegment 27

FSC	Fourier Shell Correlation
FZEM	Forschungszentrum für Elektronenmikroskopie
G	Guanin
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
LAU	Light Absorption Unit
MAT	Methylamine Tungstate
MDFF	Molecular Dynamics Flexible Fitting
MPI-MG	Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik
mRNA	Messenger-RNA
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAT-10	Protein Associated with the ER Translocon, 10 kDa
PBS	phosphate buffered Saline
PDB	Protein Data Bank
PglB	Protein glycosylation B (Protein)
PLV	künstlicher Transskriptionsfaktor (Split-Ubiquitin-System): Protein A-LexA-VP16
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
proA	Protein A
psi	Pound per Square Inch: 1 psi = 6895 Pa

RAM	Rabbit Anti Mouse
RAMP(s)	Ribosome Associated Membrane Protein(s)
RCT	Random Conical Tilt
RNC(s)	Ribosome Nascent chain Complex(es)
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec61	Sec61-Komplex
SP(C)	Signal Peptidase (complex)
SR	SRP Receptor
SRP	Signal (sequence) Recognition Particle
SSH	Sec Sixty-one Homolog
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TM	Transmembranhelix
TRAM	Translocation-Associated Membrane protein
TRAP	Translocon Associated Protein (complex)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UE	Untereinheit
WLX*	Wash Lipid eXtra* buffer
YPD	Yeast Peptone Dextrose medium
YTE	Yeast Translation Extract (Hefetranslationsextrakt)

1 Einleitung

Strukturbiologie ist die Wissenschaft vom supramolekularen Design des Lebens.

Für das grundsätzliche Verständnis der Funktionsweise biologischer Systeme erweist sich die Strukturaufklärung der beteiligten Makromoleküle bzw. deren supramolekularer Anordnung als unabdingbar. Damit lassen sich die biochemisch gewonnenen Daten zu einem stimmigen Gesamtbild zusammenfügen und darauf aufbauend weitergehende Aussagen treffen, z.B. hinsichtlich der Funktionsweise.

„It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.“

Mit diesen Worten ziehen Watson und Crick (Watson und Crick, 1953) eine richtungweisende Schlussfolgerung aus der von ihnen vorgeschlagenen Struktur der DNA (Abbildung 1), zeigen hier anschaulich den Erkenntnisgewinn aus der Struktur zur Funktion der Biomoleküle.

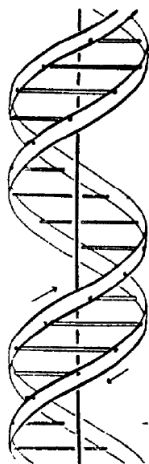


Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Struktur (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Watson und Crick, 1953.).

Inzwischen ermöglicht die Weiterentwicklung und Neuentwicklung von biophysikalischen Messmethoden, wie z.B. NMR-Spektroskopie, Röntgenkristallografie und Kryoelektronenmikroskopie, die Strukturbestimmung komplexer biologischer Nanomaschinen.

So half z.B. die in den 1980er Jahren gereifte Kryoelektronenmikroskopie (van Heel *et al.*, 2000; Frank, 2002) bei der kristallografischen Aufklärung der 50S-Untereinheit von *Haloarcula Marismortui* (Steitz, 2010; Abbildung 2).

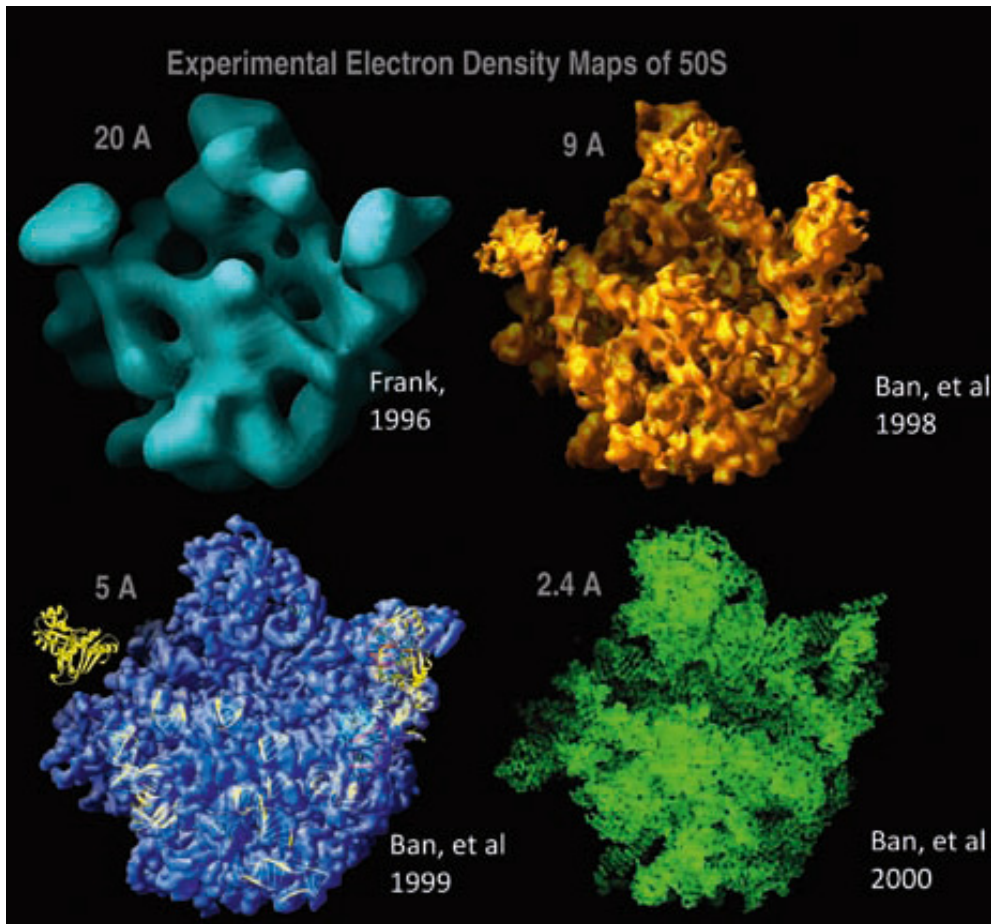


Abbildung 2: Stufenweise Verbesserung der Auflösung der Struktur der 50S-Untereinheit von *Haloarcula Marismortui* (© The Nobel Foundation, Steitz, 2010).

Vor der Aufklärung der Struktur und daraus abgeleitet der Wirkungsweise eines Biomoleküls steht notwendigerweise zuerst die Charakterisierung und Präparation desselben. Eindrucksvoll ist dies z.B. von Blobel (Blobel, 2000) für das Protein-Targeting (Abbildung 3) geschildert worden.

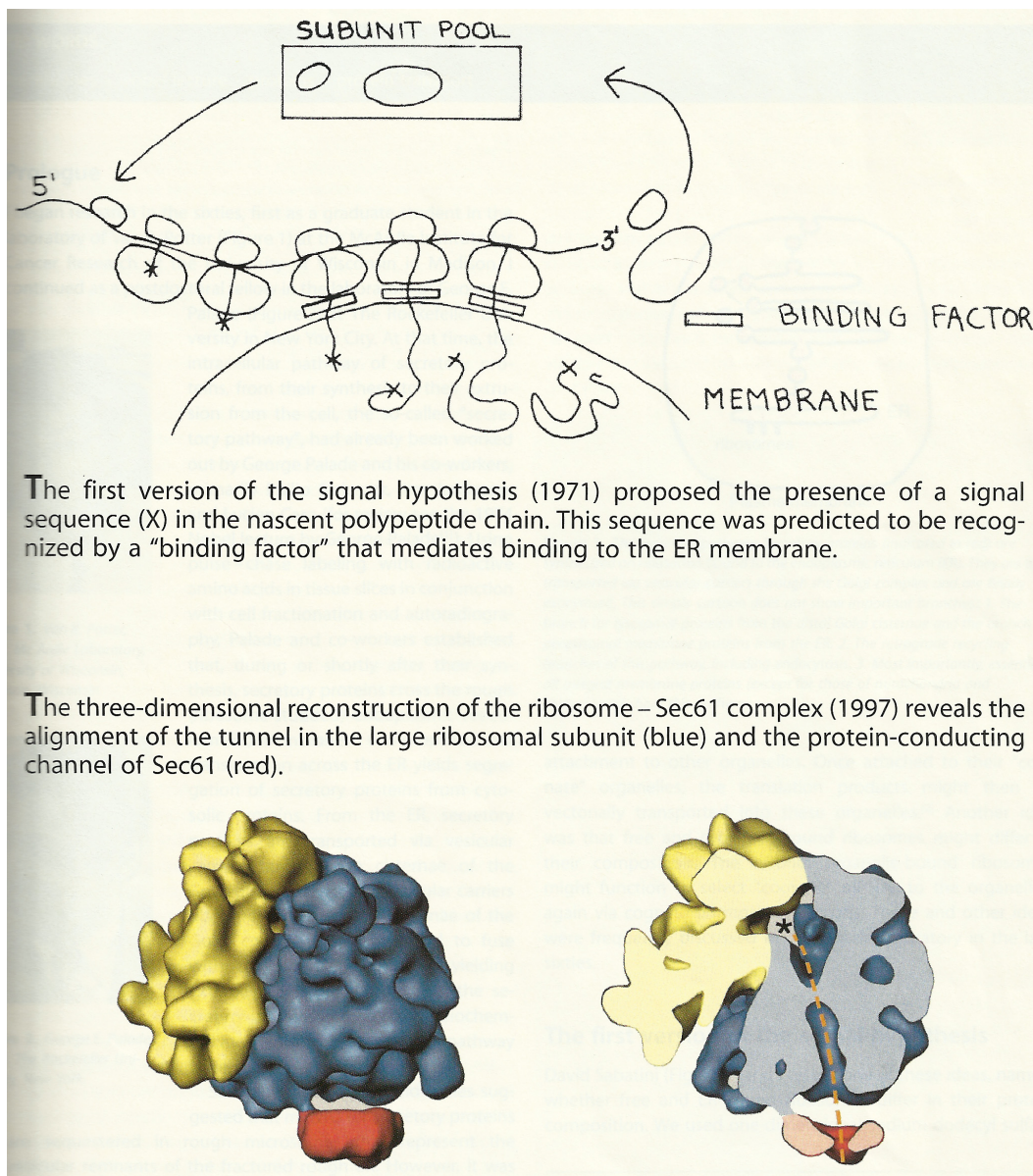


Abbildung 3: Von der Hypothese zur Struktur (© WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, Blobel, 2000).

1.1 Die kotranslationale Translokation

Im Zytosol erzeugte Proteine müssen in der eukaryotischen Zelle an ihre Bestimmungsorte gelangen, also in Zellkompartimente transportiert bzw. in deren Membran inseriert werden (Abbildung 4).

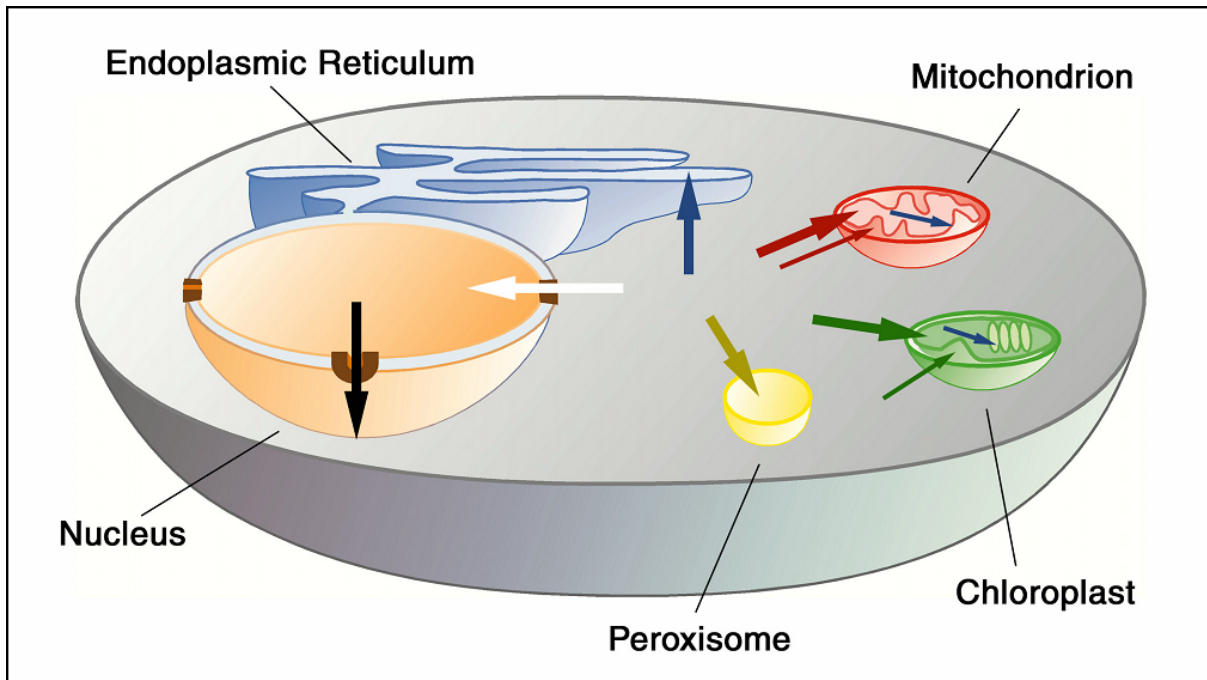


Abbildung 4: Transportwege aus dem Zytosol in verschiedene Zellkompartimente bzw. innerhalb derselben (freundlicherweise von Roland Beckmann).

Den Transport durch Membranen bezeichnet man als Translokation, die während oder nach Abschluss der Proteinbiosynthese erfolgt, d.h. kotranslational oder posttranslational. Dafür verwendet die Zelle Sortiersignale, die Teil der neu entstehenden naszierenden Proteinkette sind, und von Zielort-spezifischen Faktoren erkannt werden (Beckmann, 2002).

Das wurde bereits in der 1971 aufgestellten Signalthypothese (Blobel und Sabatini, 1971) für den Weg sekretorischer Proteine von membrangebundenen Ribosomen in das Endoplasmatische Retikulum postuliert. In den darauf folgenden Forschungen zur kontranslationalen Translokation konnten die einzelnen Komponenten gefunden und in ein größeres Bild im Zusammenspiel des makromolekularen Nanoorchesters der Zelle eingezeichnet werden.

Nach den gleichen grundlegenden Prinzipien funktioniert auch der bakterielle Proteintransport ins Periplasma und in verschiedene Zellorganellen, wobei hier je nachdem an Stelle des membrangebundenen Ribosoms als treibende Kraft im Falle der posttranslationalen Translokation andere Proteine eine Rolle spielen.

Bei der kotranslationalen Translokation bindet zuerst der Signalsequenzerkennungspartikel (Signal sequence Recognition Particle, SRP) die Signalsequenz eines gerade synthetisierten Peptids, das aus dem ribosomalen Proteintunnel hervortritt und transferiert das Ribosom mit Hilfe des SRP-Rezeptors (SR) zu einem verfügbaren Translokon (Halic und Beckmann, 2005; Abbildung 5).

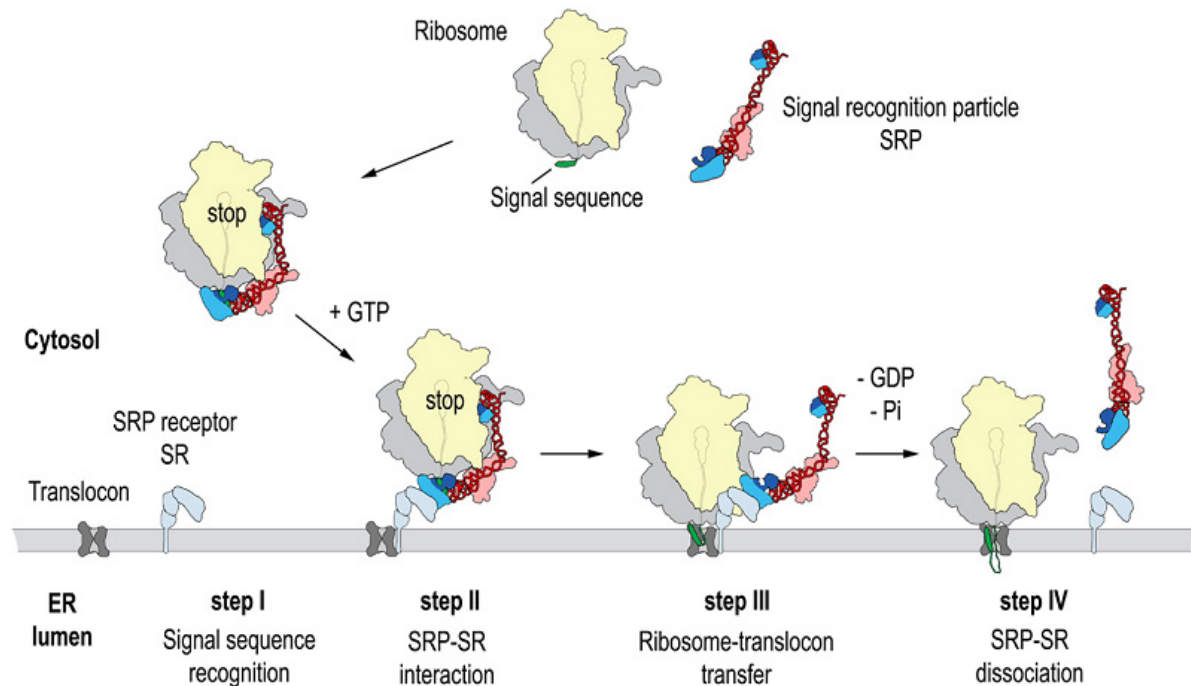


Abbildung 5: Signalsequenzerkennung und Transfer des Ribosoms zum Translokon (freundlicherweise von Roland Beckmann): Der Signalsequenzerkennungspartikel (SRP) erkennt und bindet die Signalsequenz der naszierenden Proteinkette am Ribosom und stoppt bzw. verlangsamt zunächst die weitere Translation. Über den SRP-Rezeptor (SR) wird das Ribosom zum Translokon rekrutiert. SRP und SR dissoziieren dann vom aktiven, die Translation fortsetzenden Translokon.

Das Translokon ist dabei die Struktur in der Membran, mit der das daran gebundene Ribosom zum Zwecke der Translokation interagiert. Mittels Gefrierbruchtechnik, bei der die Membran des Endoplasmatischen Retikulums gespalten wurde, konnte eine Größe von 105 Å bis 110 Å für die äquimolaren Komplexe der ribosomalen Bindestellen und damit assoziierter Proteine ermittelt werden (Ojakian *et al.*, 1977; und besonders Giddings und Staehelin, 1980).

Transiente oder permanente Komponenten des Translokonkomplexes konnten anfangs durch Fotocrosslinking mit der naszierenden Proteinkette gefunden werden (vgl. Johnson und van Waes, 1999).

Ein systematischer Ansatz insbesondere zur Bestimmung der mit dem Ribosomen assoziierten Membranproteine, RAMPs (Wang und Dobberstein, 1999; oder direkt Potter und Nicchitta, 2002: Abbildung 6) kann helfen, diese weiter zu kategorisieren.

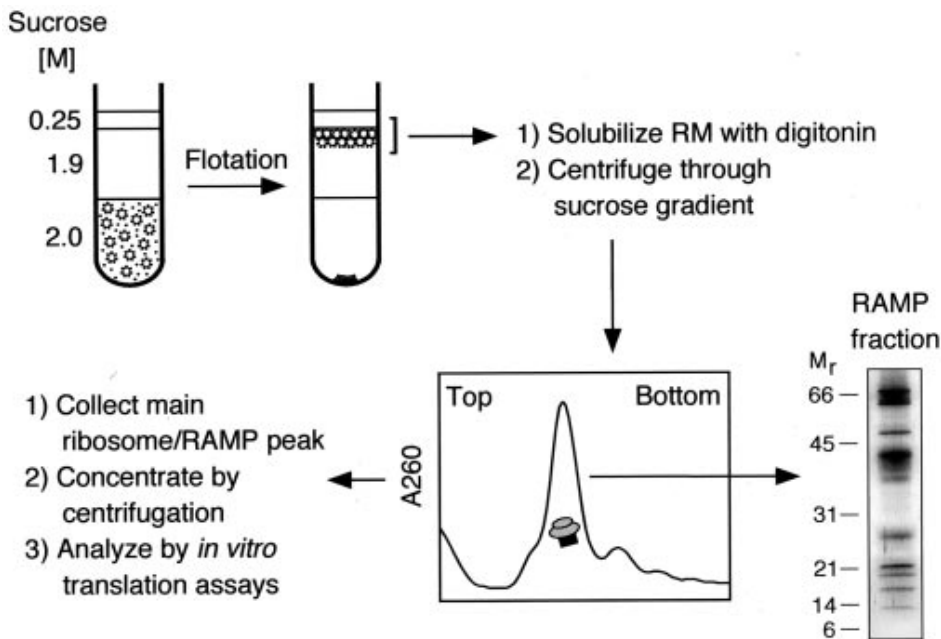


Abbildung 6: Ribosomenassoziierte Membranproteine, RAMPs (freundlicherweise aus Potter und Nicchitta, 2002): Dargestellt ist die Gewinnung der RAMPs.

Der Sec61-Komplex bildet den Kern des Translokons (Wang und Dobberstein, 1999; Johnson und van Waes, 1999) als ribosomenbindenden proteinleitenden Kanal (postuliert von Blobel und Dobberstein (I), 1975). Elektrophysiologisch konnte das von Simon und Blobel (Simon und Blobel, 1991) gezeigt werden wie auch durch Rekonstitutionsexperimente der gereinigten Komponenten (Görlich und Rapoport, 1993).

In *Mammalia* ist das translokationsassoziierte Membranprotein TRAMP (Translocation-Associated Membrane protein) ebenso essentiell (Görlich und Rapoport, 1993). TRAMP interagiert mit der Signalsequenz und ist an der Integration von Membranankern beteiligt (nach Meyer, 2001). Es reguliert, welche Teile der naszierenden Kette während einer Translokationspause dem Zytosol zugänglich gemacht werden (Hedge *et al.*, 1998).

Da die N-Glykosylierung naszierender Glykoproteine im ER-Lumen zeitlich und notwendigerweise räumlich mit der Translokation gekoppelt ist, muss sich die Oligosaccharyltransferase (OST) in der unmittelbaren Nähe des proteinleitenden Kanals befinden (vgl. Kelleher und Gilmore, 2006) und damit assoziierter Bestandteil des Translokons sein (Wang und Dobberstein, 1999).

Analoges gilt auch für den Signalpeptidasekomplex (SPC: Evans *et al.*, 1986), der die Signalsequenz während der Translokation abschneidet (Blobel und Dobberstein (II), 1975). Die Signalpeptidase und die Oligosaccharyltransferase wirken dabei sequentiell zusammen (vgl. Chen *et al.*, 2001).

Der Signalpartikelrezeptor (SR) ist für die *in vitro* Rekonstitution der kotranslationalen Translokation erforderlich (Görlich und Rapoport, 1993), wenn er auch wohl wegen seines geringeren Anteils im Verhältnis zu ER-Membran gebundenen Ribosomen nur transienter Bestandteil des Translokons ist (vgl. Gilmore *et al.*, 1982).

Nichtessentieller Bestandteil des Translokons ist der mit naszierenden Proteinen vernetzbare und ribosomenassoziierte TRAP-Komplex (Translocon Associated Protein (complex): vgl. Hartmann *et al.*, 1993). Eine *in vivo* Funktion ist unbekannt, es scheint aber ein Zusammenhang mit der Proteinfaltung zu bestehen (vgl. Fons *et al.*, 2003 und Nagasawa *et al.*, 2007). TRAP konnte zusammen mit dem Sec61-Komplex am Ribosom visualisiert werden (Ménétret *et al.*, 2008 und Ménétret *et al.*, 2005).

Ebenso nichtessentiell ist das substöchiometrisch im Translokonkomplex vorliegende RAMP4p (Ribosome-Associated Membrane Protein 4), das in ähnlichem Maße wie der Sec61-Komplex mit Ribosomen assoziiert (vgl. Görlich und Rapoport, 1993). Eine Funktion im Zusammenhang mit ER-Stress und der Glykosylierung wurde gefunden (Yamaguchi *et al.*, 1999). Es wird durch das Ribosom zum Translokon rekrutiert (Pool, 2009).

Desweiteren spielen luminale ER-Proteine eine Rolle: so z.B. BiP (Immunoglobulin-heavy-chain-binding protein), das bei der Insertion von Proteinen in den Sec61-Komplex hilft, die vollständige Translokation unterstützt und die Translokonpore versiegelt (nach Tyedmers *et al.*, 2003).

In Spezialfällen finden sich noch weitere RAMPs (vgl. Martínez-Gil *et al.*, 2011), wie z.B. PAT-10 (Protein Associated with the ER Translocon, 10 kDa: Ismail *et al.*, 2008), das an der Opsinbiogenese beteiligt ist.

Das Ribosomen-gebundene Translokon besteht also aus einer Vielzahl von transienten Proteinkomplexen mit verschiedenen Aufgaben, deren Kern der Sec61-Komplex ist (Martínez-Gil *et al.*, 2011). Zudem kann das Ribosom in Abhängigkeit von der naszierenden Kette eine Strukturänderung des Translokons bewirken (Liao *et al.*, 1997).

Ein Ribosomen-gebundenes *Mammalia*-Translokon mit den essentiellen Komponenten Sec61-Komplex und TRAMP sowie den vermutlich permanenten Bestandteilen OST und SPC – ohne die die Translokationskapazität stark herabgesetzt ist (Nicchitta und Blobel, 1990) – würde nach der maßstäblichen modellhaften Zusammenstellung (Abbildung 7 aus Johnson und van Waes, 1999) bereits die beobachtete Größe von ~ 100 Å erreichen.

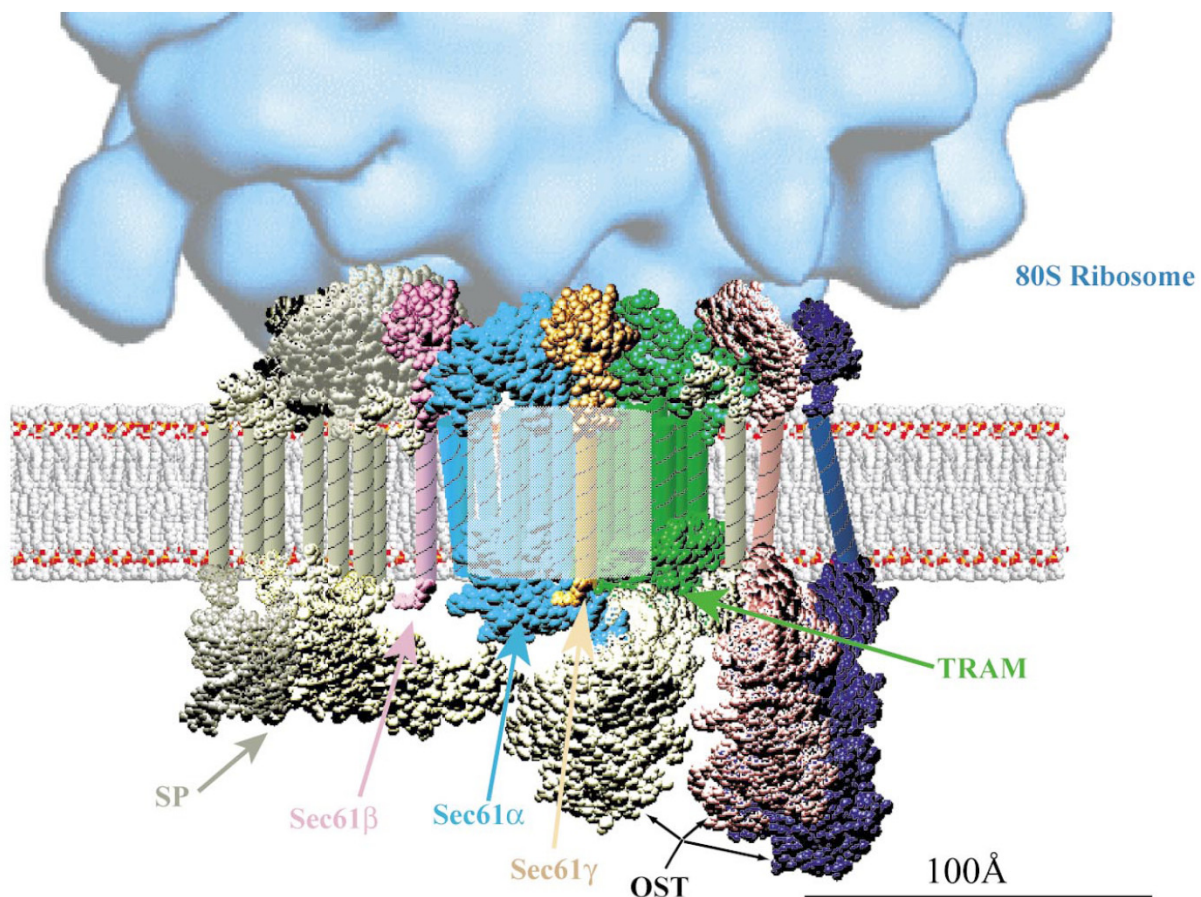


Abbildung 7: Maßstäbliches modellhaft zusammengesetztes *Mammalia*-Translokon mit Ribosom (Republished with permission of Annual Reviews from Johnson und van Waes, 1999; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc): Signalpeptidasekomplex (SP), Sec61-Komplex (α , β , γ), Oligosaccharyltransferase (OST), translokationsassoziiertes Membranprotein (TRAM).

Auxiliäre, zumeist transiente Komponenten würden die Komplexität der Struktur insbesondere im Zusammenspiel mit unterschiedlichen synthetisierten Proteinen weiter erhöhen.

1.1.1 Der proteinleitende Kanal

Im Gegensatz zum hypothetischen direkten Proteintransport durch oder in die Membran (von Heijne und Blomberg, 1979; Engelman und Steitz, 1981) wurde der Vorschlag eines proteinleitenden Kanals (Blobel und Dobberstein (I), 1975) lange Zeit kontrovers diskutiert (vgl. Blobel, 2000).

Ein solcher Kanal sollte bestimmte Forderungen erfüllen: er besteht aus integralen Membranproteinen, bindet die Signalsequenz sowie das Ribosom und schafft eine wässrige (aqueous) Verbindung durch die Lipiddoppelschicht für die naszierende Proteinkette (nach Blobel, 2000).

Über gentechnische Experimente (Mutationsscreens und Klonierung) sowie gegen Sec61p gerichtete Antikörper konnte Sec61p als ein integrales ER-Membran gebundenes Protein gefunden werden, das für die Translokation essentiell ist (vgl. Stirling *et al.*, 1992). Durch *in vitro* Rekonstitution mit gereinigten ER-Membrankomponenten wurde das für den heterotrimeren Sec61-Komplex bestätigt (Görlich und Rapoport, 1993).

Signalpeptide binden und öffnen in der bakteriellen Plasmamembran analoge Kanäle, wie im *Mammalia* System (Simon und Blobel, 1992), wobei nachgewiesen wurde, dass der Sec61-Komplex die Signalsequenz erkennt (Jungnickel und Rapoport, 1995; Plath *et al.*, 1998).

Das am proteinleitenden Kanal gebunden bleibende Ribosom hält diesen in einer offenen, Ionen-durchlässigen Konformation nach der Termination der Translation durch Puromycin und dem daraus folgenden Release der Proteinkette in das ER-Lumen (Simon und Blobel, 1991), was auch die Durchlässigkeit kleiner neutraler Farbmoleküle erklärt (Heritage und Wonderlin, 2001). Die starke Ribosomenassoziation (Görlich *et al.*, 1992) kann auf die spezifische Bindung des Sec61-Komplexes unter physiologischen Salzbedingungen zurückgeführt werden (Kalies *et al.*, 1994), was sich in der Bindungskonstante (K_D) mit hochaffinen 5 nM (nach Raden und Gilmore, 1998) bzw. ~ 10 nM (Beckmann *et al.*, 1997) widerspiegelt (vgl. bes. Kalies *et al.*, 1994; vgl. Prinz *et al.*, 2000; vgl. Raden *et al.*, 2000). Im Widerspruch dazu sollen leere *E. coli* Ribosomen nur eine Affinität von ~ 2 μ M für den SecYEG (bakterielles Homolog des Sec61-Komplexes) haben (Mitra *et al.*, 2005).

Fluoreszenz-Quenching Experimente mit eingebauten Fluoreszenzmarkern in der naszierenden Proteinkette, die nur luminal zugänglich waren, beweisen die wässrige Umgebung eines hydrophilen zum Zytosol undurchlässigen Tunnels bis hinauf ins Ribosom – dieser Kanal ist erst ab einer Kettenlänge von ca. 70 Aminosäuren geöffnet (Crowley *et al.*, 1993 und Crowley *et al.*, 1994; vgl. Rapoport *et al.*, 1996). Durch analoge Versuche wurde die Größe der Pore während der

kotranslationalen Translokation auf bis zu 40 Å bis 60 Å Durchmesser bestimmt (Hamman *et al.*, 1997). Die enge Ribosomen-Sec61-Verbindung schützt die naszierende Proteinkette und den Sec61-Kanal vor proteolytischem Abbau und kann nur durch Puromycin/Hochsalzbedingungen gelöst werden (nach Rapoport *et al.*, 1996).

Sowohl die Ionen-dichte zytosolische Ribosom-Sec61-Verbindung als auch die Porengröße befinden sich im Widerspruch zu den bisherigen strukturellen Ergebnissen (vgl. Becker, 2007; siehe Abbildung 9).

Membranproteine können durch die gleichen Kanäle in die Membran inseriert werden (High *et al.*, 1993; Görlich und Rapoport, 1993; vgl. a. Rapoport *et al.*, 1996). Dazu öffnet der Sec61-Komplex lateral (Martoglio *et al.*, 1995) und erlaubt die Interkalation einer hydrophoben Sequenz in die Lipiddoppelschicht (Singer *et al.*, 1987) nach dem Erkennen einer Stopp-Transfer-Sequenz (Blobel, 1980; vgl. a. Simon und Blobel, 1991).

Dabei kommen die Transmembransegmente, sobald sie sich im Inneren des proteinleitenden Kanals befinden, in Kontakt mit Lipiden (vgl. Rapoport *et al.*, 2004). Die Bindungsstelle ist am Interface (Heinrich *et al.*, 2000) zwischen dem proteinleitenden Kanal und der Lipiddoppelschicht lokalisiert (vgl. Plath *et al.*, 1998).

Im Jahr 2004 konnten van den Berg *et al.* (van den Berg *et al.*, 2004) die Kristallstruktur von SecYE β , des *Archaea*-Homologs zum Sec61-Komplex, aus *Methanococcus jannaschii* mit einer Auflösung von 3,2 Å aufklären (Abbildung 8):

Die von SecY, der α -Untereinheit (UE) mit 10 Transmembranhelices (TMs) gebildete Sanduhrform mit der Verjüngung in der Mitte auf 5 Å bis 8 Å von ursprünglich 20 Å bis 25 Å von der zytosolischen Seite wird von den zwei Helices von SecE (γ -UE) eingeklammert. An der dritten Seite der aus zytosolischer Aufsicht ungefähr rechteckigen Form befindet sich die nichtessentielle Sec β -Helix, was an der Front des SecYE β -Monomers Platz für das laterale Öffnen des pseudosymmetrischen SecY-Moleküls (TM1 bis TM5 und TM6 bis TM10) zur Lipiddoppelschicht lässt.

Herausragendstes Detail des SecY-Kanals ist der im periplasmatischen Trichter sitzende Stopfen, der aus einem kurzen Stück der Transmembranhelix 2 (TM2a) gebildet wird. Zusammen mit der dichtungsartigen Verjüngung, deren hydrophobe Aminosäuren von der translozierenden Proteinkette passiert werden (Cannon *et al.*, 2005), verhindert er die Permeation kleiner Moleküle (vgl. Park und Rapoport, 2011). Die geschlossene Konformation wird durch den Stopfen stabilisiert (Li *et al.*, 2007), wohingegen sich durch die laterale Öffnung die Verbindung lösen soll

(Gumbart und Schulten, 2007). In verschiedenen lateral geöffneten Kristallstrukturen (ein hydrophober Spalt, zytoplasmatisch (mit einem Anti-SecY Fab-Fragment): Tsukazaki *et al.*, 2008; ein Fenster zum Lipidkern (mit SecA): Zimmer *et al.*, 2008; eine durchgängige Öffnung (mit insertierter C-terminaler Helix eines zweiten SecY): Egea und Stroud, 2010) schließt der Stopfen aber immer noch den Kanal. Der Stopfen wird sich im geöffneten Zustand des Kanals in Richtung SecE bewegen (vgl. Harris und Silhavy, 1999), wenn auch eine Bewegung in Richtung der Spitze von TM7 beobachtet wurde (Zimmer *et al.*, 2008).

Die Signalsequenz interkaliert zwischen TM2b und TM7 am Interface zwischen Kanal und Lipiden (Plath *et al.*, 1998).

Gegenüberliegend befindet sich die Scharnierregion H5/6 (Hinge), die ein Öffnen an der Front ermöglichen soll, umklammert von SecE (van den Berg *et al.*, 2004). Das Scharnier dürfte sich aber innerhalb der Linkerregion von TM5 befinden, wobei SecE wohl nicht die postulierte Klammerfunktion hat (Gumbart und Schulten, 2007).

Wichtig für die Ribosomenbindung ist der zytosolische Loop L8/9 des Sec61-Komplexes (Raden *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005). Der zytosolische Loop L6/7 ermöglicht die kotranslationale Translokation (Raden *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005), wohingegen in Bakterien der homologe Loop L6/7 von SecY auch für die Bindung erforderlich ist (Ménétret *et al.*, 2007).

Diese Bindungen und Loops kann man auch in Kryo-EM-Modellen von entsprechenden Ribosomen-Sec-Komplexen erkennen (Mitra *et al.*, 2005; Ménétret *et al.*, 2007; Ménétret *et al.*, 2008 sowie höher aufgelöst: Becker *et al.*, 2009; Gumbart *et al.*, 2009; Frauenfeld *et al.*, 2011).

Ebenso an der Ribosomenbindung beteiligt ist der C-Terminus (10C) der α -Untereinheit des Sec-Komplexes (Raden *et al.*, 2000), wobei 10C essentiell für den Proteintargeting-Prozess ist (Egea und Stroud, 2010; vgl. a. Chiba *et al.*, 2002).

Die nichtessentielle β -Untereinheit des Sec-Komplexes interagiert mit dem SRP-Rezeptor (SR: Helmers *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2008) und in Gegenwart membrangebundener Ribosomen mit der Signalpeptidase (Kalies *et al.*, 1998). Sie bindet *in vitro* spezifisch an Ribosomen (Levy *et al.*, 2001).

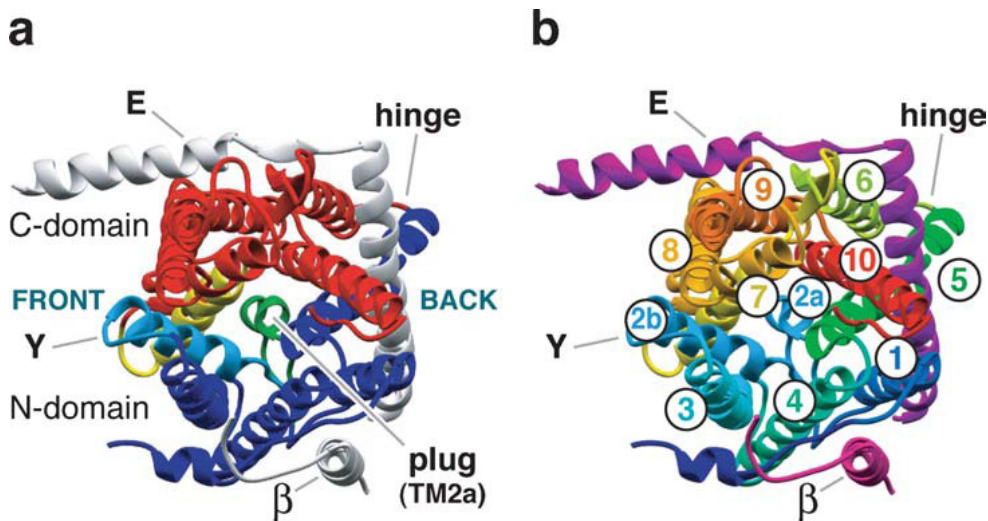


Abbildung 8: SecYE β -Struktur in der zytosolischen Aufsicht (Republished with permission of Annual Reviews from Osborne *et al.*, 2005; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc): SecY (Y), SecE (E), Sec β (β), Scharnierregion (hinge), nummerierte und kolorierte Helices von SecY.

Aus der Struktur schließt man darauf, dass ein SecYE β -Monomer oder ein Sec61-Komplex als Teil eines Oligomers den funktionalen proteinleitenden Kanal bilden könnte (vgl. van den Berg *et al.*, 2004). Das wird auch biochemisch unterstützt (Kalies *et al.*, 2008; vgl. Osborne und Rapoport, 2007).

Niedrig und mittel aufgelöste Kryo-EM-Strukturen werden dahingehend interpretiert, Oligomere (Tetramere, Trimere, Dimere) des Sec61/SecY-Komplexes zu enthalten; bei hochaufgelösten Kryo-EM-Strukturen findet man monomere proteinleitende Kanäle, die von einer Lipid/Detergens-Mizelle umgeben sind oder sich in einer Membrenumgebung befinden (nach Frauenfeld, 2011). Die aktive Form des proteinleitenden Kanals könnte ein einzelnes Monomer sein (Yahr und Wickner, 2000). Für nicht-translatierende Ribosomen bindet nach quantitativer massenspektroskopischer Untersuchung ein Sec-Kanal an ein Ribosom (Ménétret *et al.*, 2007 und Ménétret *et al.*, 2008).

Nahezu allen Kryo-EM Ribosom-Translokation-Strukturen (Beckmann *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2002; Ménétret *et al.*, 2005, Ménétret *et al.*, 2007 und Ménétret *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2009; Frauenfeld *et al.*, 2011; vgl. Abbildung 9) gemeinsam ist, dass die Translokationstrukturen neben ribosomaler RNA an den universellen ribosomalen Adapter rpL25(L23p) und rpL35(L29p) binden, an den ebenso der SRP und der Trigger Faktor docken (Blau *et al.*, 2005). Diesen Kontakt hat auch der Dimer von Mitra *et al.* (Mitra *et al.*, 2005), wobei die Hauptkontakte aber über die rRNA Helix 24 und Helix 59 erfolgen.

Meist liegen der ribosomale Peptidtunnelausgang und eine Kanalpore übereinander.

Es kann auch Ribosom-Lipid-Kontakte geben (vgl. Frauenfeld *et al.*, 2011).

Die Größe der Translokondichte bleibt für Ribosomen-Sec61-Komplexe unter 100 Å Durchmesser, für Translokonkomplexe aus nativen Membranen liegt sie darüber.

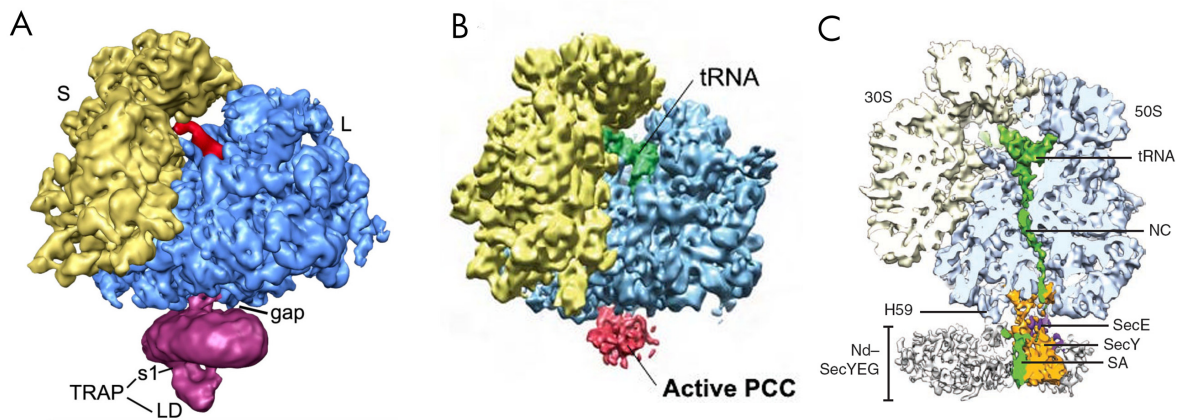


Abbildung 9: hochaufgelöste Kryo-EM Strukturen von Ribosom-Sec-Translokon-Komplexen (A reprinted from Ménétret *et al.*, 2008 with permission from Elsevier. B from Becker *et al.*, 2009. Reprinted with permission from AAAS. C reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Structural & Molecular Biology Frauenfeld *et al.*, 2011.): *Mammalia* Ribosom-Sec61-TRAP-Komplex (A); *S. cerevisiae* Ribosom-Ssh1-Komplex (B); *E. coli* Ribosom-SecYEG-Komplex in einer Nanodisc.

Man kann bei den vorliegenden Präparationen Fehlbindungen aufgrund der Ribosomenaffinität des Sec61/SecY-Komplexes nicht ausschließen, da die Ribosomen-Kanal-Komplexe in einer künstlichen Targeting Reaktion, d.h. ohne SRP, erzeugt wurden (nach Raden *et al.*, 2000). Mit dem SRP durchgeführte Integrationsassemblierungen und anschließender Vernetzung derselben zeigen eine Verbindung von Rpl17(L22) und Sec61 β p ab einem Abstand von 3 Å (Pool, 2009), was aber auch durch die hochaufgelösten Kryo-EM-Strukturen nicht bestätigt werden kann.

1.1.2 Die Oligosaccharyltransferase

Glykosylierte Proteine oder Lipide sind essentiell für die strukturelle Integrität, Stabilität, Zellsignalisierung und -kommunikation (nach Hug und Feldman, 2011).

Wie bei der Gepäcklogistik eines Flughafens dienen Proteinglykosylierungen als ein Etikett für das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgikomplex, z.B. über den Faltungsstatus, die Aufenthaltsdauer im ER und die Zielbestimmung (sinngemäß nach Helenius und Aebi, 2001).

Im ER findet die erste Stufe der vielschichtigen Prozessierungen auf Basis der N-verknüpften Proteinglykosylierung statt, die hier die Proteinfaltung und Qualitätskontrolle umfasst (vgl. Helenius und Aeby, 2004).

Dabei verknüpft die eukaryotische Oligosaccharyltransferase (OST) am Stickstoffatom der Asparaginseitenkette eines in gestreckter Konformation (Nilsson und von Heijne, 1993; Whitley *et al.*, 1996) vorliegenden Polypeptids mit der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr (X≠Pro) kovalent das durch den lipidgebundenen Träger Dolicholpyrophosphat bereitgestellte verzweigte 14-fach Oligosaccharid Glc₃Man₉GlcNAc₂ kotranslational im Lumen des ER (auch posttranslational: vgl. Ruiz-Canada *et al.*, 2009; Kowarik *et al.*, 2006).

Die ER-Membran gebundene OST sollte assoziierter Bestandteil des Translokons sein (vgl. 1.1). Anti-Ribophorin-Antikörper verhindern in *Mammalia* das Targeting zur Translokation (Yu *et al.*, 1990) und die gesamte OST lässt sich an Ribosomen in der Nähe des Polypeptid-Exittunnels binden (Harada *et al.*, 2009).

Alle in äquimolaren Mengen vorliegenden acht heterologen Untereinheiten (davon fünf essentielle: Ost1p, Ost2p, Stt3p, Wbp1p, Swp1p und drei für die maximale OST-Aktivität erforderliche: Ost3p/Ost6p (homolog), Ost4p, Ost5p in *S. cerevisiae*) lassen sich aufgrund biochemischer und molekulargenetischer Untersuchungen in drei Subkomplexe gliedern: Ost6p/Ost3p-Ost4p-Stt3p, Ost2p-Wbp1p-Swp1p und Ost1p-Ost5p (Abbildung 10, A: Karaoglu *et al.*, 1997; Knauer und Lehle (BBA), 1999; Kelleher und Gilmore, 2006).

OST48 in *Mammalia* (Wbp1p in *S. cerevisiae*) fungiert über die luminalen Domänen als Brücke zwischen RI und RII (Ost1p und Swp1p in *S. cerevisiae*), wobei Dad1 (Ost2p in *S. cerevisiae*) über die zytoplasmatische Domäne mit OST48 im Komplex interagiert (Fu *et al.*, 1997). Ost1p und Ost3p sind über Stt3p in die OST eingebunden (Zufferey *et al.*, 1995).

Durch chemisches Crosslinking (Yan *et al.*, 2003) und das Split-Ubiquitin-System – das aber viele falsch-positive Resultate liefern soll (Stagljar, 2003), bei dem vereinfacht zusammengefasst, die zwei Ubiquitinhälften-Tags an zwei interagierenden Proteinen reassoziieren und ein Reporterereignis induzieren, wurden Organisationsmodelle der OST und des OST-Sec61-Komplexes erstellt (Abbildung 10, B und C: Yan *et al.*, 2005; Chavan *et al.*, 2005), die z.T. im Widerspruch zur Subkomplextgliederung (Chavan *et al.*, 2005) und untereinander stehen (Chavan und Lennarz, 2006).

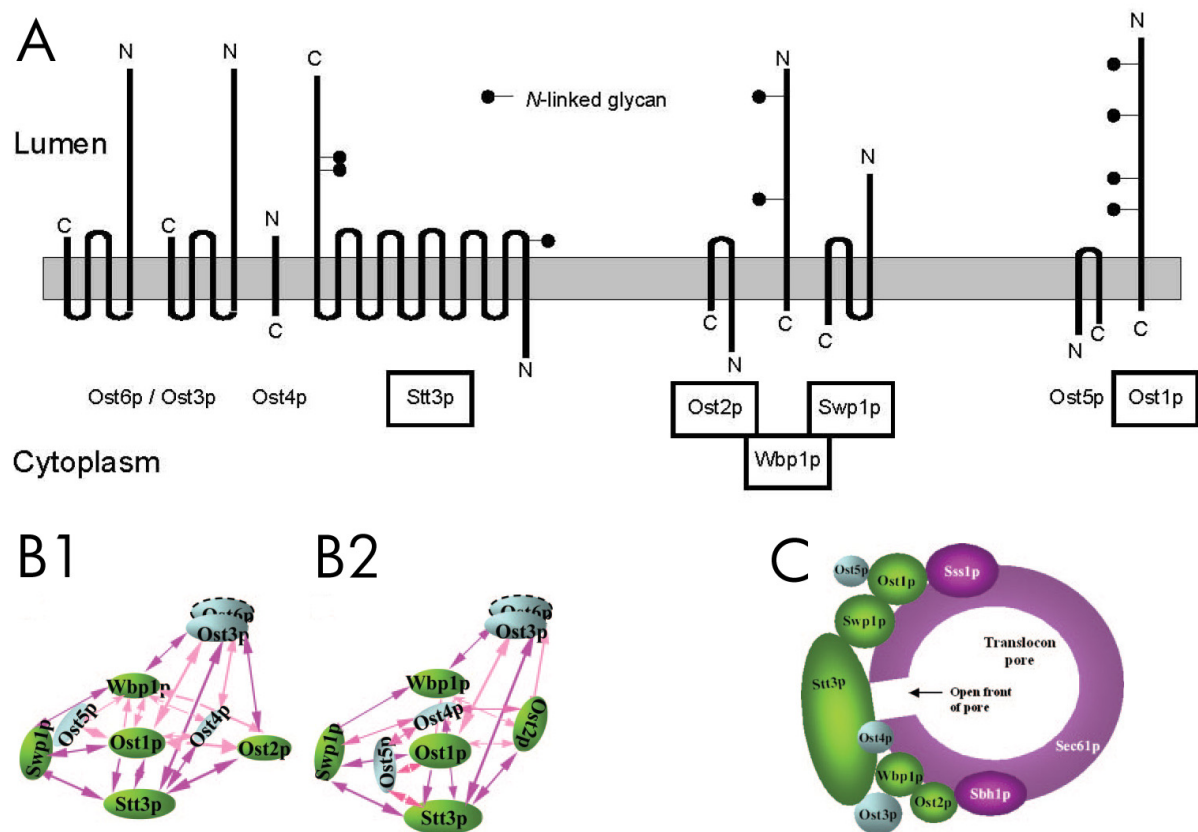


Abbildung 10: Organisationsmodelle der Oligosaccharyltransferase aus Hefe (A aus Weerapana und Imperiali, 2006 by permission of the Society for Glycobiology by Oxford University Press. B1, B2 freundlicherweise aus Yan *et al.*, 2005. C freundlicherweise aus Chavan *et al.*, 2005.): 3-Subkomplexe-Modell der acht heterologen Untereinheiten (entweder mit dem Homolog Ost3p oder Ost6p), Membrananteile und die Größe der luminalen Domänen sind erkennbar, essentielle Untereinheiten sind eingerahmt (A); *in vitro* (B1) und *in vivo* (B2) Interaktionsmodell der Untereinheiten (grüne essentiell); Koordinationsmodell des OST-Sec61-Komplexes (C).

Es konnten ca. 500 kDa große OST-Komplexe durch Blue-Native-Gelelektrophorese bestimmt werden (Spirig *et al.*, 2005; Shibatani *et al.*, 2005), die vermutlich der 3D-EM-Struktur eines OST-Dimers entsprechen (Chavan *et al.*, 2006). In *Mammalia* wurden zusätzlich noch OST-Komplexe von ca. 600 kDa im Verbund mit dem Sec61-Komplex und von ca. 700 kDa im Verbund mit dem Sec61-Komplex und des TRAP-Komplexes gefunden (Shibatani *et al.*, 2005; vgl. z.B. den nativen Membrankomplex in Ménétret *et al.*, 2008; vgl. a. Nikonov *et al.*, 2002).

In Abhängigkeit von Ost3p oder Ost6p assoziiert die OST mit unterschiedlichen Sec61-Kanälen, vermutlich über die β -Untereinheit des Sec61-Komplexes (Yan und Lennarz, 2005).

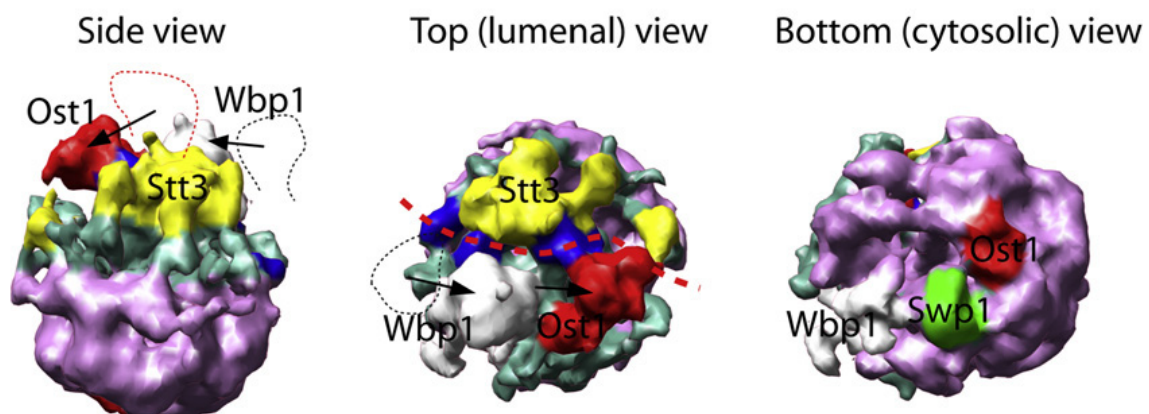
Durch Blue-Native-Gelelektrophorese konnte dann aber auch gezeigt werden, dass die OST aus zwei Isoformen besteht, die entweder Ost3p oder Ost6p enthalten (Schwarz *et al.*, 2005). Die ermittelte Molmasse von 255 kDa spricht für ein OST-Monomer.

Vermutlich ein OST-Monomer in einer Mizelle bei einer Molmasse von 360 kDa und einer Transmembranfläche von 7000 \AA^2 konnte durch Negative Stain und Kryo-EM vitrifizierter Partikel dargestellt werden (ca. $20 \text{ \AA}/12 \text{ \AA}$ Auflösung in Abbildung 11: Li *et al.*, 2008):

Durch einen Proteintag (C-terminales Maltose-bindendes Protein) wurde versucht, einige Untereinheiten nebst ihren luminalen Domänen zuzuordnen, wobei die Membranorientierung festgestellt werden konnte. Die luminalen Domänen von Ost1p und Wbp1p scheinen flexibel zu sein, was aus dem Vergleich der beiden 3D-Rekonstruktionen hervorgeht.

Übereinstimmendes Merkmal ist ein „*long and continuous low-density groove*“, der die naszierende Polypeptidkette am mittig angeordneten Katalysezentrum vorbeiführen soll.

A Cryo-EM map



B Negatively stained EM map

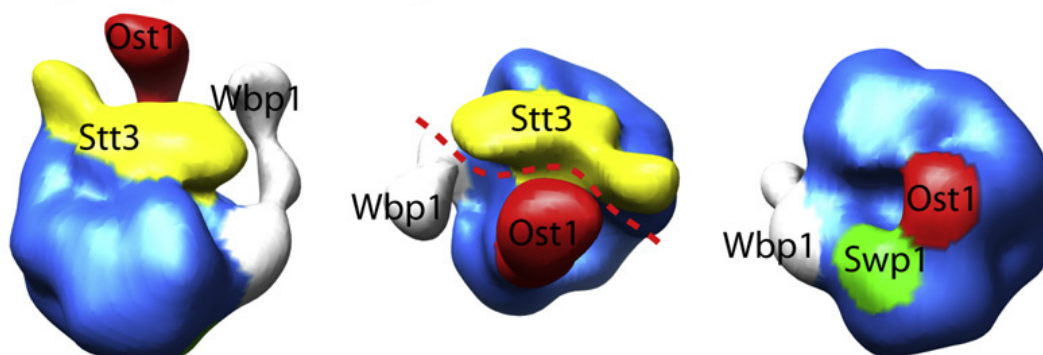


Abbildung 11: 3D-EM-Strukturen der Oligosaccharyltransferase (Reprinted from Li *et al.*, 2008 with permission from Elsevier): Kryo-EM-Struktur (A) und zum Vergleich die Negative-Stain-Struktur (B); „*long and continuous low-density groove*“ als rot gestrichelte Linie; markierte Untereinheiten: Ost1p (Rot), Wbp1p (Weiss), Swp1p (Grün), Stt3p (Gelb).

Aufgrund der 3D-Struktur würde die OST mit mehr als den postulierten 15 Aminosäuren (Karamyshev *et al.*, 2005) des naszierenden Polypeptids in Kontakt kommen müssen. Das vorgeschlagene mittig angeordnete Katalysezentrum wäre aber in Übereinstimmung mit den minimal 40 Å Distanz der Glykosylierungsstelle ab Eintritt ins Lumen des ER (Nilsson und von Heijne, 1993; Whitley *et al.*, 1996).

Von der einzigen Untereinheit der OST aus *Campylobacter lari* PglB (protein glycosylation), dem Homolog der katalytischen Untereinheit Stt3p, konnte die Kristallstruktur aufgeklärt werden (Abbildung 12, A: Lizak *et al.*, 2011):

Die Transmembranregion formt am Interface mit der periplasmatischen Domäne zum einen die peptidbindende Tasche, in der das Akzeptorpeptid eine Schlaufe formt, und zum anderen die den lipidgebundenen Oligosaccharid-Donor aufnehmende Tasche mit dem katalytischen Zentrum. Beide sind durch einen Tunnel verbunden. Sowohl der Reaktionsmechanismus als auch peptiderkennende/-bindende Motive lassen sich modellieren.

Dabei sieht die periplasmatische Domäne auf der Akzeptorpeptidseite hakenförmig aus.

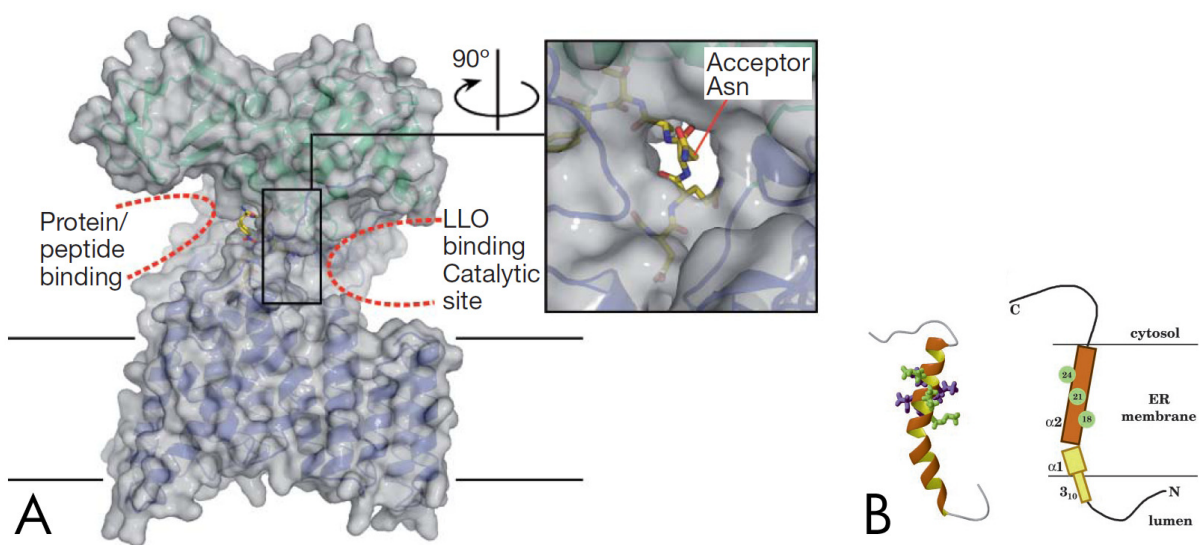


Abbildung 12: Strukturen von zwei OST-Untereinheiten mit Membranpositionierung (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Lizak *et al.*, 2011. B freundlicherweise aus Zubkov *et al.*, 2004.): Kristallstruktur von PglB aus *C. lari* (A), Lipid linked oligosaccharid (LLO); NMR-Struktur von Ost4p aus *S. cerevisiae*, Helixdarstellung und Schema mit den angezeigten konservierten Aminosäurepositionen (B).

Die kleinste Untereinheit Ost4p (Abbildung 12, B) weist einen Knick in ihrer membranspannenden Helix auf und verfügt über konservierte Aminosäuren, die wichtig für den

Zusammenhalt des Subkomplexes Stt3p-Ost4p-Ost3p/Ost6p sind (nach Zubkov *et al.*, 2004; Spirig *et al.*, 2005).

Ebenfalls essentiell für den Einbau in die OST ist die Transmembranhelix von Wbp1p (Li *et al.*, 2003), so dass die OST und der OST-Sec61-Komplex wohl über Protein-Protein-Kontakte stabilisiert werden (Chavan *et al.*, 2005).

Zur katalytischen Untereinheit Stt3p der OST (Nilsson *et al.*, 2003; Yan und Lennarz (JBC), 2002) kamen also evolutionär immer weitere Untereinheiten hinzu (Kelleher und Gilmore, 2006), die so z.B. die Präferenz des transferierten Oligosaccharids bestimmen (Castro *et al.*, 2006). Dabei ist Stt3p für die Assemblierung der OST erforderlich, hat aber auch einen Einfluss auf die Substratspezifität (Zufferey *et al.*, 1995).

Ribosomen tragend (Ribophorin I, II) nannte man die zuerst gefundenen Untereinheiten der *Mammalia* OST, die stöchiometrisch mit den ER gebundenen Ribosomen assoziierten und sich mit diesen vernetzen ließen (Kreibich *et al.*, 1978; Kreibich *et al.* (JCB, Proteins I), 1978; Kreibich *et al.* (JCB, Proteins II), 1978; vgl. a. Görlich *et al.*, 1992; vgl. a. Wang und Dobberstein, 1999).

Ribophorin I (Ost1p in *S. cerevisiae*) fungiert wahrscheinlich als ein substratspezifisches Chaperon (Wilson und High, 2007), das potentielle Substrate in der Nähe des katalytischen Zentrums hält (Wilson *et al.*, 2005), weil dessen luminale Domäne dabei mit einem synthetischen fotoreaktiven Akzeptorpeptid verknüpfbar ist (Yan und Lennarz (PNAS), 2002).

Ribophorin II (Swp1p in *S. cerevisiae*) dient wohl der Regulation des an Dolichol gebundenen Oligosaccharids (Kelleher *et al.*, 2007) in Verbindung mit dem damit vernetzbaren Wbp1p (Pathak *et al.*, 1995; Bause *et al.*, 1997; vgl. a. den Subkomplex Ost2p-Wbp1p-Swp1p).

Ost3p/Ost6p könnten auch eine Chaperonaktivität über die luminale Domäne haben (Jamaluddin *et al.*, 2011; Schulz *et al.*, 2009) und befinden sich in der Nähe des aktiven Zentrums (Yan und Lennarz (JBC), 2002; vgl. a. den Subkomplex Ost3p/Ost6p-Ost4p-Stt3p). Beide weisen auch eine Homologie zum *Mammalia* Protein TRAP α auf (Knauer und Lehle (JBC), 1999; vgl. 1.1), das aber nur eine Transmembranhelix hat.

Die maximale Glykosylierungsrate erfordert alle Untereinheiten der OST (Lennarz, 2007) auch die hinsichtlich ihrer Funktion unbestimmten Ost2p und Ost5p.

1.2 Elektronenmikroskopische 3D-Strukturaufklärung

Insbesondere für große Biomoleküle bzw. supramolekulare Komplexe erweisen sich NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallografie als begrenzt geeignet.

Die NMR ist hinsichtlich der zu untersuchenden Molekularmasse limitiert, wenn auch der 900 kDa große GroEL-GroES-Komplex aufgeklärt werden konnte (Fiaux *et al.*, 2002).

Bei der Kristallografie stellt neben der Kompliziertheit, Kristalle zu züchten, die Lösung des Phasenproblems (vgl. z.B. Steitz, 2010) für MDa-große Komplexe eine Herausforderung dar.

Beide Methoden haben Schwierigkeiten bei der Untersuchung membrangebundener Partikel. Es werden jeweils Milligramm-Mengen hochreiner Probe benötigt.

Demgegenüber werden für die Kryo-Elektronenmikroskopische (Kryo-EM) 3D-Strukturaufklärung nur Mikrogramm-Mengen an Untersuchungsmaterial benötigt (Beckmann, 2002). Die Homogenität der nativen Probe ist dabei von höchster Wichtigkeit – bzgl. der Reinheit sind die Anforderungen im Vergleich zur NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallografie geringer.

Der schematische Ablauf für die Kryo-EM von der Probenpräparation bis zur Modellbildung ist in Abbildung 13 gezeigt.

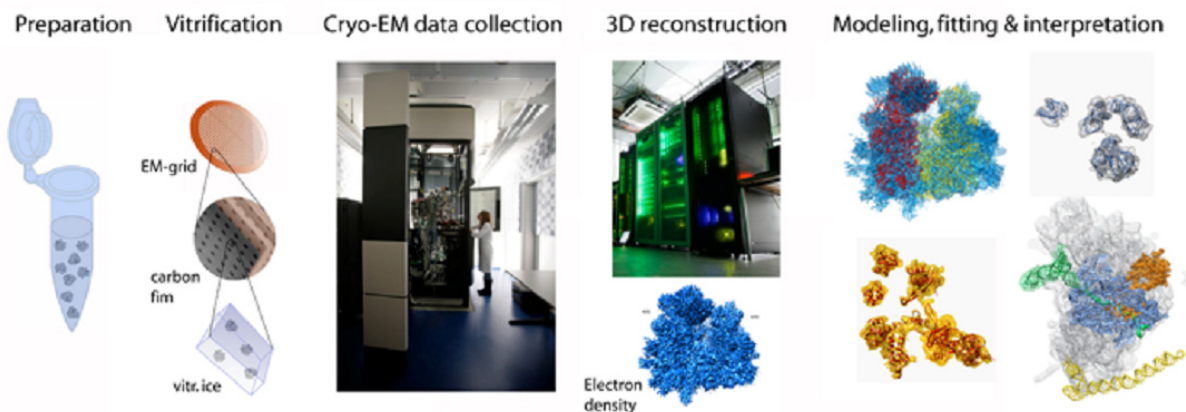


Abbildung 13: Flussbild der Kryo-EM 3D-Strukturauswertung (freundlicherweise von Thomas Becker): Nach der biochemischen Probenpräparation (Preparation) wird die Probe vitrifiziert (Vitrification). Es folgt die Datensammlung am Kryo-Elektronenmikroskop (Cryo-EM data collection) nebst nachfolgender digitaler Aufbereitung mit der anschließenden 3D-Rekonstruktion (3D reconstruction) der Probenstruktur aus den gewonnenen Daten. Abschließend steht die Interpretation mit der Modellentwicklung (Modell, fitting & interpretation).

Am Anfang steht die Probenpräparation. Der Isolation der Komponente(n) folgt bei Bedarf die Rekonstitution zu einem biologisch relevanten supramolekularen Komplex, d.h. durch zuvor bestimmte *in vitro* Inkubationsbedingungen bilden die Bestandteile eben diesen, z.B. den Ribosomen-Sec61-Komplex (Beckmann *et al.*, 1997). Für eine erfolgreiche 3D-Rekonstruktion ist dabei vielmehr die Probenhomogenität relevant, da verunreinigende Partikel in der Datenanalyse aussortiert werden, gemischte Konformationen aber die erreichbare Auflösung begrenzen können (Zhou, 2008).

In Abhängigkeit von der Molekularmasse und der Bekanntheit einer zum Vergleich einsetzbaren Referenzstruktur (z.B. des Ribosoms für den Ribosom-Sec61-Komplex) werden die Proben nun für das TEM aufbereitet. Probenträger ist dabei ein Kupfernetzchen, genannt Grid (ca. 5 mm Durchmesser), mit löchrigem Kohlefilm, auf dem eine dünne Kohleschicht aufgebracht wurde. Nach der Hydrophilisierung durch Plasmaionisation kann die Probe aufgetragen werden.

Bei einer unbekannten Biomolekülstruktur wird fast immer zunächst die Negative Stain Struktur ermittelt (Frank, 1996). Dazu wird die Probe mit einer Schwermetallsalzlösung versetzt. Durch das Elektronenmikroskop wird dann die Schwermetallsalzhülle des Biomoleküls abgebildet. Trocknungs- und Stainartefakte begrenzen aber die Nützlichkeit dieser Methode.

Eine Hybridmethode stellt die Kryo-Negative Stain Technik dar, die den durch das Schwermetall erzeugten ausgezeichneten Kontrast mit der Präparatschonung durch die Kryotechnik zu kombinieren versucht (zur Übersicht: De Carlo und Harris, 2011). Unter Kryobedingungen kann strukturell gebundenes Wasser gehalten werden und verfälscht somit nicht die Resultate.

Für die Kryo-EM Einzelpartikelrekonstruktion (vgl. van Heel *et al.*, 2000; Frank, 2002) wird das Wasser der Probe durch Schockgefrieren derselben in flüssigem Ethan bei -196 °C vitrifiziert, d.h. in einen glasartigen nichtkristallinen Zustand versetzt – die Biomolekülkomplexe werden damit annähernd physiologisch unter Beibehaltung der nativen Struktur kryofixiert (vgl. a. Dubochet *et al.*, 1988).

Vereinfacht zusammengefasst werden beim Durchgang des Elektronenstrahls durch die Probe die Elektronen an den Atomrümpfen elastisch gestreut. Für die schwermetallkontrastierten Moleküle resultiert das aufgrund der höheren Ablenkungswinkel zunächst in einem substantiellen (ca. 50 %) Amplitudenkontrast, d.h. Streuabsorptionskontrast.

Durch Interferenz des gebeugten, phasenverzögerten Elektronenstrahls mit dem ungebeugten entsteht der sogenannte Phasenkontrast, d.h. Beugungskontrast. Um dabei optimale Ergebnisse zu erreichen, muss mit einem schwachen Unterfokus gearbeitet werden. In Abhängigkeit von den

Defokuswerten und von der Größe der Strukturdetails werden diese unterschiedlich kontrastreich übertragen. Es kommt sogar zu Kontrastumkehrungen (positiv/negativ). Gekennzeichnet wird dies durch die Kontrast-Transfer-Funktion (CTF, Contrast Transfer Function).

Wenn auch durch die Kryobedingungen bei der Aufnahme Strahlenschäden der Probe minimiert werden, so verschlechtert die inelastische Streuung mit den Objektelektronen das Signal-Rausch-Verhältnis insbesondere der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Objekte. Erschwerend kommt hinzu, dass die Aufnahmen bei Niedrigdosisbedingungen (~ 10 Elektronen/ \AA^2) erfolgen müssen, um Strahlenschäden zu vermeiden.

Je Aufnahme werden ~ 1000 Partikel, also abgebildete Biomolekülkomplexe, mit unterschiedlicher relativer räumlicher Orientierung zur Filmebene abgelichtet.

Die 2D-Bilder der Partikel stellen somit die Kontrast-Transfer-abhängigen und Partikel-orientierungsabhängigen Projektionen der 3D-Partikel-Elektronendichte dar, die durch computergestützte mathematisch-statistische Verfahren rekonstruiert werden kann.

Man benötigt für die erfolgreiche Berechnung der 3D-Rekonstruktion die Aufnahmen des Partikels aus allen Raumrichtungen, gekennzeichnet durch die Eulerwinkel – der Rotationswinkel bezogen auf die drei Raumachsen.

Dazu könnte man den Probenträger im Mikroskop systematisch drehen und kippen und von einem makromolekularen Biokomplex die erforderlichen Aufnahmen vornehmen. Dabei würden aber durch die akkumulierte Strahlendosis die Strahlenschäden des Präparats schrittweise zunehmen und damit die erreichbare Auflösung spürbar begrenzen (Lucić *et al.*, 2005; vgl. a. Radermacher, 1988).

Daher nutzt man Verfahren, die darauf beruhen, dass sich die Partikel auf dem Probenträger in unterschiedlicher räumlicher Orientierung anordnen und man daraus folgend Aufnahmen einer Partikelsorte aus unterschiedlichen Raumrichtungen erhält.

1.2.1 Random Conical Tilt

Bei einer unbekannten Struktur kann man durch das Random Conical Tilt-Verfahren (Radermacher *et al.*, 1987; vgl. a. Radermacher, 1988) eine initiale 3D-Rekonstruktion erzeugen.

Es beruht auf der zufälligen (random) Partikelorientierung auf dem Probenträger. Den kippt (tiltet) man und erhält somit Partikelabbildungen aus der Kipprichtung. Für eine bestimmte Partikellage gibt es aber viele Möglichkeiten in der Ebene gedreht vorzuliegen. Bestimmt man die

Drehwinkel, kann man die gekippten Partikel aufnahmen in einer Konusgeometrie (conical) anordnen (Abbildung 14).

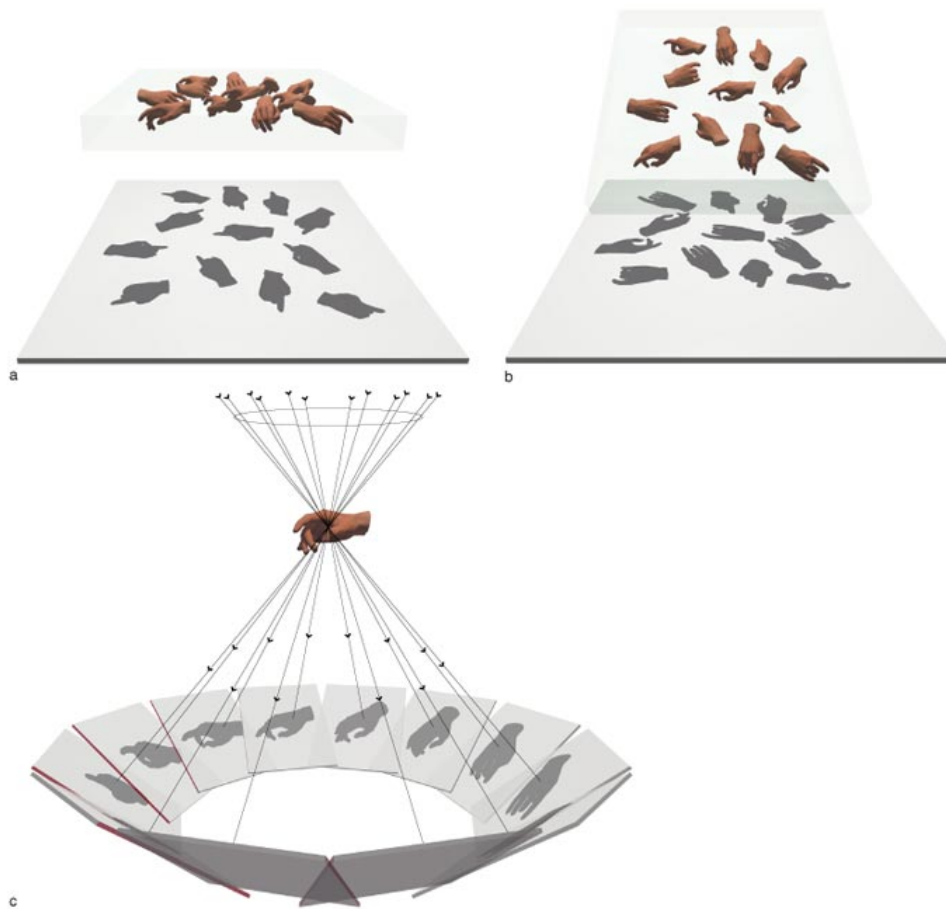


Abbildung 14: Schema des Random Conical Tilt Ansatzes (Mit freundlicher Genehmigung aus Frank, 1998.): Für genau eine Ausrichtung in der Ebene rotierter Partikel (a) lässt sich durch Kippen (b) anhand der Rotationswinkel die Anordnung der gekippten Partikelabbildungen in einer Konusgeometrie (c) zur Rückprojektion, d.h. zur Berechnung der 3D-Rekonstruktion, bestimmen.

Für jede bestimmte Partikellage erhält man durch Rückprojektion der Partikel aufnahmen eine Missing Cone Rekonstruktion, d.h. es fehlen in Konusrichtung zunehmend Strukturdetails.

Unter Verwendung unterschiedlicher Missing Cone Rekonstruktionen, d.h. für unterschiedliche Partikellagen auf dem Probenträger, lässt sich eine vollständige Initialrekonstruktion zusammensetzen.

Praktisch nutzt man die Methode für Negative Stain Präparationen unbekannter Strukturen, da der hohe Kontrast die referenzfreie Alignierung (vgl. i. Ggs. 1.2.3) erleichtert.

Es werden von einer Stelle des Probenträgers zwei Aufnahmen gemacht: zuerst eine um einen Winkel von 45° bis 60° gekippte und danach eine ungekippte.

Die ungekippten Partikel haben also gegenüber den gekippten Partikeln die doppelte Strahlendosis erhalten und werden daher nur zur Bestimmung der Partikelklassen herangezogen. Dazu werden alle ungekippten Partikel zunächst zu einem Globaldurchschnitt gemittelt und dann einer multivariaten Datenanalyse, der Korrespondenzanalyse unterzogen (für Details siehe Frank, 1996; http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/techs/MSA/index.htm).

Dabei wird die Variabilität der Bilddetails absteigend mit abbildungsbestimmenden komplex zusammengesetzten Merkmalen erklärt. Meist werden durch die ersten drei berechneten Merkmale die Bilddetails hinreichend (> 90 %) beschrieben, anhand derer die Partikelbilder nun sortiert werden können.

Bildlich gesprochen legt man ein neues Koordinatensystem in einen mehrdimensionalen Raum. Die Faktoren erklären mit absteigender Wertigkeit die Daten und enthalten dabei unterschiedliche Anteile der Merkmale bezogen auf das alte Koordinatensystem, d.h. sie sind zusammengesetzt und können nicht mehr notwendigerweise einfach verstanden werden.

Nach der daraus abgeleiteten hierarchisch absteigenden Klassifikation (vgl. a. http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/techs/classification/tutorial.html) – Gleiches zu Gleichem, Verschiedenes zu Verschiedenem – sind ähnliche Partikelorientierungen in einzeln differenzierten Klassen zusammen gruppiert, d.h. geclustert.

Jeder dieser Cluster wird nun als eine Partikellage auf dem Probenträger aufgefasst. Aus den dazugehörigen gekippten Partikelabbildern kann dann wie zuvor beschrieben eine Missing Cone Rekonstruktion berechnet werden.

Mehrere Missing Cone Rekonstruktionen lassen sich dann zu einer Gesamtrekonstruktion vereinigen.

1.2.2 Common Lines

Ebenso wird für unbekannte, meist negativ kontrastierte Strukturen der Common Lines Ansatz aufgrund des Central Section Theorems (DeRosier und Klug, 1968) oder auch der Angular Reconstitution Ansatz (van Heel, 1987) genutzt.

Dabei haben zwei aus verschiedenen Raumwinkeln erzeugte zweidimensionale (2D) Projektionen einer 3D-Struktur immer eine gemeinsame Projektionslinie (van Heel *et al.*, 1997; Abbildung 15, A). Im Fourierraum entspricht die 2D-Projektion einem planaren Schnitt durch die 3D-Fouriertransformation der Struktur. Jedwede zwei 2D-Fourier-Projektionen desselben

Objektes haben eine gemeinsame Linie, welche ein Strahl der 3D-Fouriertransformierten ist (Singer *et al.*, 2010; Abbildung 15, B).

Anhand der damit ermittelten Winkelbeziehungen zwischen den 2D-Projektionen kann man diese im Raum orientieren und daraus eine Initialrekonstruktion herstellen.

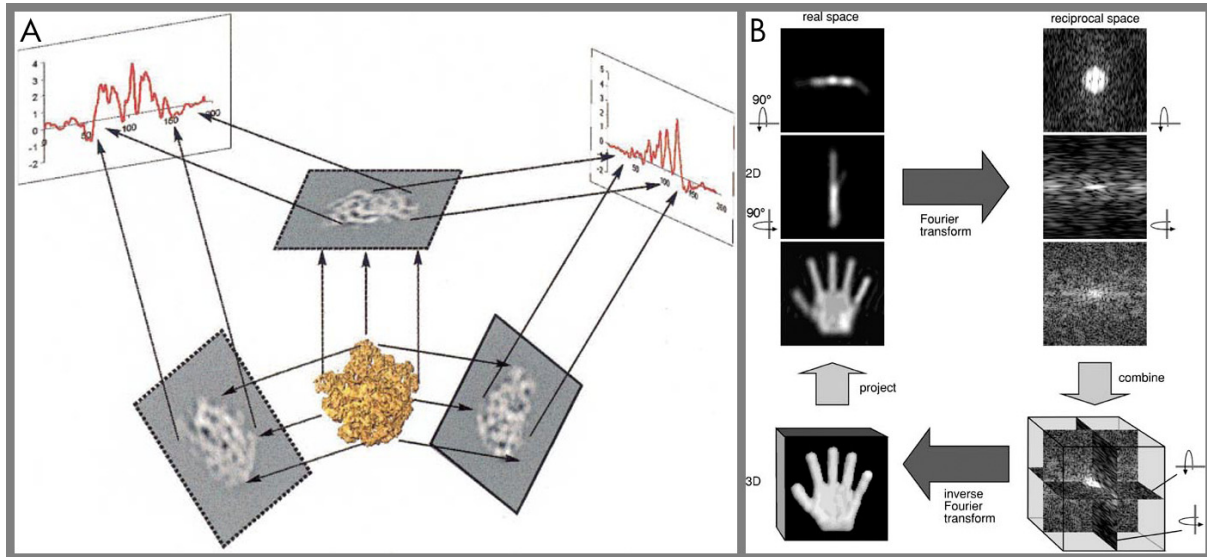


Abbildung 15: Common Lines und Central Section (A freundlicherweise aus van Heel *et al.*, 2000 genehmigt durch Cambridge University Press. B aus Steven und Belnap, 2005 mit Genehmigung durch Current Protocols und Wiley & Sons.): In A sind anschaulich drei 2D-Partikelprojektionen in ihrer räumlichen Orientierung und zwei der gemeinsamen Sinogrammlinien zwischen jeweils zwei Projektionen gezeigt. In B wird schematisch vorgeführt, wie man aus drei 2D-Projektionen eines 3D-Objekts (Hand) die zentralen Schnitte im Fourierraum erzeugt, welche sich wiederum in jeweils einer gemeinsamen Linie (also zwischen zwei Schnitten) im 3D-Fourierraum zusammenfügen und damit die Rekonstruktion ermöglichen.

Praktisch sucht man die Common Lines aufgrund des besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses in den Klassendurchschnitten ähnlich orientierter Partikelbilder (Shaikh *et al.*, 2008), die man durch k-means Clustering erhält (Penczek *et al.*, 1996).

Zunächst werden wieder alle Partikelprojektionen zu einem Globaldurchschnitt gemittelt (analog 1.2.1). Im nächsten Schritt unterzieht man sie einem k-means Clustering. Bei dem Algorithmus werden die Partikel k Clusterzentren zugeordnet, die Clusterzentren neu berechnet und dann wiederum die Partikel den k neuen Clusterzentren zugeordnet. Iterativ wird das, bis Konvergenz eintritt, wiederholt (<http://de.wikipedia.org/wiki/K-Means-Algorithmus>).

Aus den räumlich zueinander orientierten 2D-Partikelprojektionsklassendurchschnitten wird eine Initialrekonstruktion berechnet.

1.2.3 Projection Matching

Sobald man über eine Referenzrekonstruktion verfügt – ob durch *ab initio* Verfahren wie den Random Conical Tilt (1.2.1) oder den Common Lines (1.2.2) Ansatz oder aber aus vorhergehenden Strukturbestimmungen – nutzt man das Projection Matching.

Dabei bestimmt man die räumliche Partikelorientierung anhand des Vergleichs mit der Referenz. Iterativ wird dann im nächsten Schritt die zuvor durch Rückprojektion erzeugte Rekonstruktion als neue Referenz in die Berechnung eingespeist.

Der wichtigste Schritt ist die sogenannte Alignierung. Von der Referenzrekonstruktion werden systematisch, d.h. für die gewünschten Raumwinkel, Projektionen berechnet. Diese werden dann über den Kreuzkorrelationskoeffizienten mit den experimentell im Elektronenmikroskop erzeugten Partikelprojektionen verglichen (Abbildung 16).

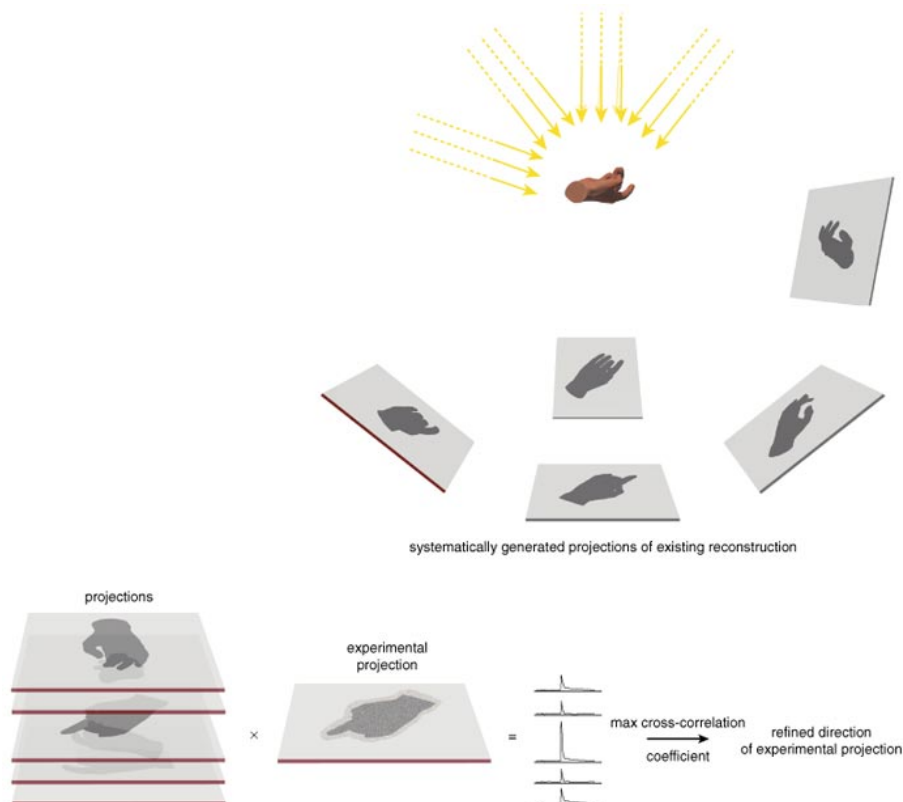


Abbildung 16: Projection Matching-Schema (Mit freundlicher Genehmigung aus Frank, 1998.): Experimentalprojektionen werden mit den systematisch erzeugten Referenzprojektionen anhand der Maximierung des Kreuzkorrelationskoeffizienten der entsprechenden Raumausrichtung für eine Rückprojektion zugewiesen.

Zusätzlich können die Experimentalprojektionen noch auf Verschiebung (shifts) und Rotation in der Ebene untersucht und anhand der Maximierung des Kreuzkorrelationskoeffizienten ausgerichtet werden.

Durch rechnerische Annäherung der Kontrasttransferfunktion (vgl. 1.2) eines Partikels kann auch die Feinstrukturinformation zur Erzeugung der Rekonstruktion herangezogen werden.

Insbesondere für die Kryoelektronenmikroskopie nativer Biomolekülkomplexe mit ihrem sehr niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis müssen ~ 100.000 Partikel für Auflösungen unter 1 nm in die Berechnung einbezogen werden.

1.2.4 Modellentwicklung

Ein großer Vorteil der 3D-Elektronenmikroskopie ist die Möglichkeit, molekulare Modelle höherer Auflösung, z.B. atomar aufgelöste NMR- oder Kristallografiestrukturen, in die 3D-EM-Struktur zu docken. Je nach erreichter Auflösung der 3D-Rekonstruktion lassen sich dabei verschiedene Strukturdetails erkennen und nutzen (Abbildung 17).

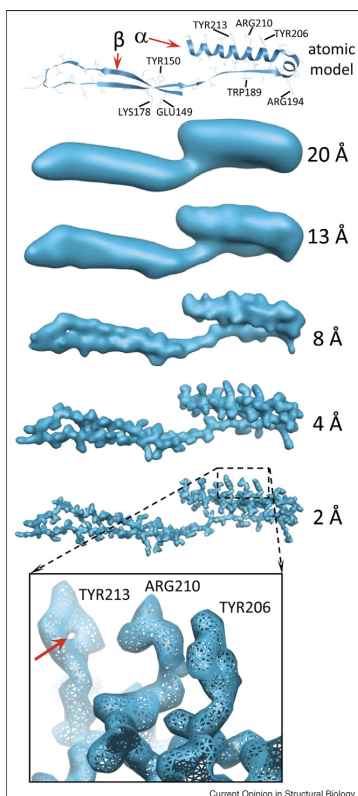


Abbildung 17: Rechnerisch bestimmte Elektronendichten unterschiedlicher abgestufter Auflösungen eines gegebenen atomaren Modells (Reprinted from Zhou, 2008 with permission from Elsevier.): Besonders markant ist der Auflösungsübergang in den Subnanometerbereich (von 13 Å auf 8 Å).

Für mittlere Auflösungen verwendet man rigid Body Techniken (Wriggers und Chacón, 2001), d.h. die höher aufgelösten Modelle werden als ein starrer Körper in der 3D-EM-Dichte positioniert. Zusammen mit der Möglichkeit, Elektronendichteunterschiede innerhalb einer EM-Rekonstruktion zu erkennen, lassen sich bereits eindrucksvolle Resultate erzielen (z.B. Spahn *et al.*, 2001).

Sobald man Sekundärstrukturdetails erkennt, d.h. man den Subnanometerauflösungsbereich erreicht, kann man die gedockten Modelle manuell flexibel anpassen bzw. computergestützt flexibel anpassen lassen (Trabuco *et al.*, 2008).

Die erstellten Hybridstrukturmodelle lassen dann eine tiefgehende Interpretation zu.

1.3 Zielsetzung

Obwohl die Oligosaccharyltransferase (OST) assoziierter Bestandteil des Ribosomen-gebundenen Translokons, also ein Ribosomen-assoziiertes Membranprotein (RAMP), sein soll, existiert dafür bisher kein struktureller und für Hefe kein biochemischer Nachweis.

Aufgrund der offensichtlichen Komplexität der Aufgabe, erscheint es sinnvoll, ein vereinfachtes aber definiertes OST-Sec61-Translokon im Verbund mit dem Ribosom zu untersuchen, d.h. eine *in vitro* Rekonstitution dieses Komplexes.

Erstens soll ein solcher Komplex biochemisch hinreichend charakterisiert werden. Dazu müssen die Komponenten isoliert, gereinigt und die Spezifität der Bindung bestimmt werden.

Zweitens soll eine 3D-Struktur der OST und der an den Ribosomen-Sec61-Komplex gebundenen OST mittels (Kryo-)EM und Einzelpartikelrekonstruktion gelöst werden. Es soll versucht werden, die molekulare Basis für die Interaktion mit dem Ribosom und dem Sec61-Ribosomen-Komplex mit Hilfe dieser Strukturen herzuleiten.

Drittens soll die 3D-Kryo-EM-Struktur eines OST-Sec61-Ribosom-Komplexes für eine Modellentwicklung genutzt werden. Aufgrund der strukturellen Homogenität und der besseren Vergleichbarkeit sollen RNCs (Ribosome Nascent chain Complexes), also programmierte Ribosomen, eingesetzt werden. Eine optimale Auflösung ist angestrebt.

Die Erstellung eines 3D-Modells des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons soll die Ergebnisse zusammenfassen.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation

2.1.1 Hefezüchtung und Stämme

Saccharomyces cerevisiae Großansätze wurden in 20 l YPD-Medium (20 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 20 g/l Dextrose) über Nacht bei 30 °C mit gleichmäßiger Luftzufuhr durch eine Fritte sprudelnd (bei Zusatz des Schauminhibitors Antifoam B: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und frühmorgentlicher Zugabe von weiterer Dextrose bis zu einer Dichte von 6 bis 9 A₆₀₀/ml herangezogen. Vorkulturen und Kleinansätze wurden jeweils in Erlenmeyerkolben bei 30 °C auf einem Rundschüttler mit 160 U/min bis zu einer Dichte von 1,5 A₆₀₀/ml gezüchtet. Die im Folgenden aufgeführten Stämme (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Roland Beckmann) exprimierten je ein genomisch mit Protein A getaggt und mit Faktor Xa-Schnittstellen versehenes Protein (Tabelle 1):

Tabelle 1: Verwandte Stämme

Stamm	mit Protein A getaggt und Faktor Xa-Schnittstellen versehenes Protein
Sec61XA	Sec61p
Sec62XA	Sec62p
Sec63XA	Sec63p
OST 3X-4	Wbp1p
SRP68XA	Srp68p

2.1.2 S100 und Mikrosomengewinnung

Durch geeignete Aufschlussbedingungen für Hefezellen bleiben die Kernmembran und das anschließende Endoplasmatische Retikulum intakt und können durch Zentrifugation zunächst von Zellwandbestandteilen und dann vom zytosolischen Extrakt (S100) getrennt werden: In einer Sorvall RC-3C Plus Zentrifuge mit einem H6000-Rotor (Sorvall, Waltham, USA) bei 4 °C mit 4500 U/min wurden die Hefezellen sedimentiert und dann in Lysispuffer (125 mM Saccharose, 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) aufgenommen. Bei 25000 psi mittels eines AVESTIN[®] EmulsiFlex-C5 Homogenisators (Avestin, Ottawa, Kanada) für größere Mengen oder bei 15000 psi mittels einer SLM Aminco[®] French

Pressure Cell Press (SLM Instruments, Urbana, USA) für kleinere Mengen erfolgte der Zellaufschluss. Zellwandbestandteile wurden durch eine Zentrifugation mit 15000 U/min bei 4 °C in einem SS34-Rotor in einer Sorvall RC24 (Sorvall) abgetrennt. Danach wurde der Überstand bei 4 °C mit 50000 U/min in einem Ti70-Rotor in einer L70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) für 21 min zentrifugiert. Der klare S100-Überstand (die flockigen Eintrübungen wurden verworfen) und die resuspendierten Mikrosomen (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 50 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren dann bei –80 °C gelagert.

2.1.3 Flotieren

ER-Membranen und daran gebundene Ribosomen schwimmen auf hochdichter Zuckerlösung auf und können somit von Aggregaten und ungebundenen Ribosomen getrennt werden (vgl. Abbildung 6): Die Mikrosomensuspension wurde auf das 5-fache Volumen verdünnt (2 M Saccharose, 100 mM KOAc, 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF). Jeweils 2 ml dieser verdünnten Suspension wurden mit je 2 ml 1,75 M Saccharoselösung (gleiche Pufferbedingungen) überschichtet und die SW60-Rotoren-Tubes mit 100 mM Saccharoselösung (gleiche Pufferbedingungen) aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation in einer L70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) mit 60000 U/min für 4 Stunden bei 4 °C wurden die flotierten Membranvesikel an der oberen Grenzsicht (zwischen 1,75 M und 0,1 M Saccharose) mit einer Pipette vorsichtig entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren dann bei –80 °C gelagert.

2.1.4 Komigration Ribosomen-assoziiierter-Membranproteine (RAMPs)

Mit einem Detergens in Lösung gebrachte Membranproteine, die an Ribosomen binden, komigrieren mit diesen bei einer Dichtegradientenzentrifugation (vgl. Abbildung 6): Die flotierten Mikrosomen wurden solubilisiert (2 % Digitonin (Calbiochem, San Diego, USA), 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM Saccharose, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF), für 15 min bei 4 °C in einer Eppendorf 5417 R Kühlzentrifuge bei 14000 U/min von unlöslichen Aggregaten getrennt und dann mit einem linearen 10 bis 30 %-igen Saccharosedichtegradienten (20 mM HEPES, 5 mM Mg(OAc)₂, 500 mM KOAc, 2 % Digitonin, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) aus einem Gradient Master (BioComp, Fredericton, Kanada) für zwei Stunden bei 4 °C im SW60-Rotor mit 45000 U/min in einer L70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) aufgetrennt.

2.1.5 Herstellen von IgG Sepharose

Zur Immuno-Affinitätschromatographie Protein A-getaggtter Proteine wird IgG an Sepharose immobilisiert: Dazu wurde 7,5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in 250 ml 1 mM HCl suspendiert und mit 1 l einer 1 mM HCl durch Zentrifugation und Resuspension in 50 ml Falcon Röhrchen (BD, Franklin Lakes, USA) in einer Centra CL2 Zentrifuge (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) bei 1000 U/min für je 5 min gewaschen. Die Slurry wurde in 100 ml kaltem Kupplungspuffer (0,1 M NaHCO₃, 0,25 M NaCl, pH 8,5) äquilibriert. 100 mg Kaninchen IgG (MP Biomedicals, Solon, USA) wurden in 17,5 ml Kupplungspuffer aufgenommen und für 90 min bei Raumtemperatur an einem neoLab Rotator (neoLab, Heidelberg, Deutschland) an die Sepharose gebunden. Nun wurde zweimal mit je 100 ml Kupplungspuffer gewaschen. Die weitere Reaktion wurde durch Inkubation mit 1 M Ethanolamin pH 9 für zwei Stunden blockiert. Danach wurde je zweimal mit Kupplungspuffer mit 1 M NaCl, dann mit Milli Q Wasser (Millipore, Billerica, USA), dann mit 0,2 M Glycin pH 2,8 und abschließend bis pH 7,4 mit PBS-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄) gewaschen. Die 50 %-ige Slurry in PBS mit 0,02 % NaN₃ wurde bei 4 °C gelagert.

2.1.6 Präparation der Oligosaccharyltransferase (OST)

Die an Wbp1p Protein A-getaggte und mit einer Faktor Xa-Schnittstelle versehene OST lässt sich zweistufig aufreinigen: im ersten Schritt durch eine Immuno-Affinitätschromatographie mit IgG-Sepharose durch Faktor Xa-Verdau und danach unter Verwendung des Anionentauschers Q-Sepharose (vgl. auch: Kelleher und Gilmore, 1994): Der Solubilisationsansatz (30 A₂₈₀/ml OST 3X-4 Mikrosomen, 2 % Digitonin (Calbiochem, San Diego, USA), 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 400 mM Saccharose, 750 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, 2,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) wurde mit einem Glas/Glas-Douncer homogenisiert und für 20 min mit 50000 U/min bei 4 °C in einem Ti70-Rotor in einer L70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) von unlöslichen Aggregaten getrennt. Der Solubilisationsansatz wurde verdünnt (15 A₂₈₀/ml OST 3X-4 Mikrosomen, 1 % Digitonin, 20 mM HEPES pH 7,5, 400 mM Saccharose, 375 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 0,25 mM EDTA, 0,5 mM MnCl₂, 1,25 mM DTT, 0,25 mM PMSF). Nun wurde bei 4 °C in 50 ml Falcon Röhrchen (BD, Franklin Lakes, USA) an einem Rotator (neoLab, Heidelberg, Deutschland) mit je 500 µl IgG-Sepharose inkubiert und diese dann mit der 12,5-fachen Menge WLX*-Puffer (20 mM HEPES, 10 % Glycerin, 100 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM MnCl₂, 0,125 % Digitonin, 0,025 mg/ml Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)) gewaschen. Mit

2,5 % 1 µg/µl Faktor Xa Protease (Promega, Madison, USA) in WLX*-Puffer wurde für 4,5 h bei Raumtemperatur auf dem Rotator (neoLab, Heidelberg, Deutschland) geschnitten und abschließend mit weiterem WLX*-Puffer die OST eluiert.

Mittels Q Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wurde bei Grundpufferbedingungen (125 mM Saccharose, 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)₂, 0,125 % Digitonin und 0,025 mg/ml Phosphatidylcholin, 0,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) die OST weiter gereinigt und aufkonzentriert: mit 200 mM KCl in Grundpuffer wurden 5 Fraktionen und dann mit 500 mM KCl in Grundpuffer weitere 5 Fraktionen eluiert. Die höchstkonzentrierten OST-Fraktionen nach Q-Sepharose wurden vereinigt und in 10000er MWCO Slide-A-Lyser Dialysetöpfchen (Pierce, Rockford, USA) gegen 100 mM KOAc, 20 mM HEPES, 125 mM Saccharose, 5 mM Mg(OAc)₂, 0,125 % Digitonin und 0,025 mg/ml Phosphatidylcholin, 1 mM DTT, 0,5 mM MnCl₂ dialysiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert. Für die Strukturbestimmung der ungebundenen OST wurde anstelle von 0,125 % Digitonin und 0,025 mg/ml Phosphatidylcholin eine 0,2 %-ige Konzentration von DeoxyBigCHAP (Calbiochem, San Diego, USA) eingestellt.

2.1.7 Sec61 Präparation

Der Sec61-Komplex lässt sich aus dem immuno-affinitätschromatographisch an IgG gebundenen heptameren Sec63-Komplex durch das Detergens Triton X-100 eluieren und dann durch den Anionenaustauscher SP-Sepharose weiter aufreinigen (Beckmann *et al.*, 2001): Analog zur OST Präparation (vgl. 2.1.6) wurden im Solubilisationsansatz 30 A₂₈₀/ml Sec63XA Mikrosomen unter gleichen Bedingungen aber ohne Zusatz von MnCl₂ anschließend verdünnt auf eine Konzentration von 15 A₂₈₀/ml mit IgG-Sepharose inkubiert und mit WLX*-Puffer gewaschen. Mit Elutionspuffer (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM Saccharose, 200 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1 % Triton X-100) wurde der trimere Sec61-Komplex aus dem heptameren Sec63-Komplex herausgelöst. Analog zur OST Präparation (vgl. 2.1.6) wurde der Sec61-Komplex nach SP-Sepharose gewonnen. Hierbei wurde allerdings SP Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Äquilibration der Säule erfolgte bei 125 mM Saccharose, 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF mit 0,5 % Triton X-100, die Elution mit 750 mM KOAc in Grundpuffer (125 mM Saccharose, 20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)₂, 0,125 % Digitonin und 0,025 mg/ml Phosphatidylcholin, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF). Der dialysierte Sec61-Komplex nach SP-Sepharose wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert.

2.1.8 Ribosomenpräparation

Im zytosolischen S100-Extrakt vorhandene Ribosomen lassen sich sedimentieren und in einer Dichtegradientenzentrifugation weiter säubern: S100-Extrakt wurde im Ti70 Rotor in einer L70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) durch je 4 ml 2 M mit 4 ml 1,5 M überlegtem Saccharosekissen (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)₂, 500 mM KOAc, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) bei 4 °C mit 54000 U/min für 1070 min zentrifugiert. Aufgenommen in 20 mM HEPES, 5 mM Mg(OAc)₂, 500 mM KOAc, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF wurden die Rohribosomen über einen linearen 10 bis 40 %-igen Saccharosedichtegradienten (20 mM HEPES, 5 mM Mg(OAc)₂, 500 mM KOAc, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) aus einem Gradient Master (BioComp, Fredericton, Kanada) für drei Stunden bei 4 °C im SW60-Rotor bei 40000 U/min aufgetrennt. Die mittels Piston Gradient Fractionator (BioComp) gesammelte Ribosomenfraktion wurde in Puffer (0,125 mM Saccharose, 5 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) mit einem TLA100.4-Rotor in einer TL 100 tabletop Ultrazentrifuge (Beckman) bei 4 °C und 100000 U/min für 42 min sedimentiert und in je 50 bis 100 µl Puffer aufgenommen, abschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei –80 °C gelagert.

2.1.9 Bindungstests

In vitro lassen sich Ribosomen mit ribosomenassoziiierenden Membranproteinen (Sec61 und/oder OST) zu dimeren/trimeren Komplexen rekonstituieren: 80S Ribosomen (40 pmol/ml im Ansatz) wurden für 5 min bei Raumtemperatur mit der 8-fachen Menge Sec61-Komplex vorinkubiert und für weitere 15 min bei Raumtemperatur mit bis zur 7-fachen Menge OST zum trimeren 80S-Sec61-OST-Komplex rekonstituiert. Die dimeren Komplexe 80S-Sec61 oder 80S-OST erhielt man durch Inkubation der Ribosomen mit dem Sec61-Komplex oder der OST für 15 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden über lineare 10 bis 40 %-ige Saccharosedichtegradienten (20 mM HEPES/KOH pH 7,5, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 0,5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,125 % Digitonin (Calbiochem, San Diego, USA), 0,025 mg/ml Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)) aus einem Gradient Master (BioComp, Fredericton, Kanada) für drei Stunden bei 4 °C im SW60-Rotor bei 40000 U/min in einer L70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) die rekonstituierten Ribosomenkomplexe von ungebundenem Sec61-Komplex oder ungebundener OST abgetrennt, mittels Piston Gradient Fractionator (BioComp) fraktioniert und danach analysiert.

2.1.10 Proteinnachweis

SDS-PAGE: Proteine in Lösung wurden mit 6 % TCA bei Zusatz von 0,0125 % Natriumdeoxycholat gefällt, mit Aceton gewaschen, in Probenpuffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 25 % Glycerol, 0,01% Bromophenolblau, 5 % 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und über 12,5 %-ige SDS-PAGE (Laemmli, 1970) Gele bei 150 V in einer Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad, Hercules, USA) laufen gelassen. Die Detektion erfolgte sichtbar mit Coomassie Brilliant Blue R250 oder fluorometrisch mit einem Phosphorfluoroimager FLA 3000 (Fujifilm, Minato, Japan) mittels der über drei Größenordnungen linearen SYPRO® Orange Färbung (Molecular Probes, Eugene, USA). Die Quantifizierung gelang durch Abgleich mit dem Broad Range Protein Marker P7702S (New England BioLabs, Ipswich, USA) und bei Bedarf 2D-densitometrisch gegen BSA-Standard: Mittels der AIDA-Software des Phosphorfluoroimagers konnten die LAU-Werte (Light Absorption Units) einzelner Banden bestimmt und der Hintergrund, d.h. das Rauschen, abgezogen werden. Die Auswertung durch Linearregression der unterschiedlichen BSA-Konzentrationen *vs.* der LAU-Werte erfolgte in MS Excel (Microsoft, Redmond, USA) und diente zur Bestimmung der Stoffmengen aufgetragener Proteine.

Western Blot: Proteintags (HA oder proA) wurden durch 45 minütiges semi-dry Western Blotting bei 1 mA/cm² in Blotpuffer (20 % MeOH, 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS) auf eine in Milli Q Wasser (Millipore, Billerica, USA) eingeweichte PROTRAN® BA 83 Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) mit zunächst einer Amido Black Färbung zur Markierung, nachfolgender Entfärbung/Waschung und danach anschließender 30 minütiger Blockierung mit Milch in TBS (5 % fettfreies Magermilchpulver in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) durch Antikörperinkubation und Chemolumineszenzreaktion identifiziert.

Antikörperbindung und ECL: 1:500 Anti-HA.11 16B12 aus Maus (BAbCO, Richmond, USA) in Milch in TBS wurde bei 4 °C über Nacht gebunden. Danach (als zweiter Antikörper) oder ausschließlich (beim Protein A-Tag) wurde 1:2500 HRP gekoppelter RAM (Horse Raddish Peroxidase, Rabbit Anti Mouse: Dianova, Hamburg, Deutschland) in Milch in TBS bei 4 °C über Nacht gebunden. Die Signale der ECL-Reaktion (100 mM Tris/HCl pH 8,5, 0,2 mM Cumarsäure, 1,25 mM Luminol, 0,009 % H₂O₂) wurden auf BioMax MR (Eastman Kodak, Rochester, USA) aufgenommen. Waschschrte erfolgten mit TBS und TBS-T (TBS mit 0,1 % Tween20).

2.1.11 mRNA Präparation

Trunkierte (DNA Templat ohne Stoppcodon) gecappte mRNA wird durch ein Translationskit erzeugt: Mittels des mMESSAGE mMACHINE™ Kits (Ambion, Austin, USA) wurde pro 20 µl Ansatz 1 µl His-HA-DP120 DNA mit 1 mg/ml (freundlicherweise von Dr. Thomas Becker zur Verfügung gestellt; Becker, 2007) bei 37 °C für einige Stunden in einem Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in mRNA transkribiert. Jeder Ansatz wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser (Ambion) und 25 µl LiCl (7,5 M bei 50 mM EDTA, Ambion) versetzt und über Nacht bei –21 °C belassen. Die aufgetauten Proben wurden für 20 min bei 4 °C in einer Eppendorf 5417 R Kühlzentrifuge bei 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die mRNA mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 14000 U/min wurde das Ethanol abgesaugt und die Probe bei Raumtemperatur trocknen gelassen. In 20 µl Wasser aufgenommen wurde die Konzentration und die Qualität bestimmt. Abschließend wurde die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die mRNA bei –80 °C gelagert.

2.1.12 DNA und RNA Nachweis

Die Konzentrationsbestimmungen der Proben erfolgen mittels UV-Spektroskopie (A_{260}) an einem Ultraspec III Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Agarose-Gelelektrophorese: Die Qualität und Zusammensetzung der Proben wurde durch Agarose-Gelelektrophorese mittels eines i-MUPID-Systems (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) bei 50 V und 30 min Laufzeit bestimmt. Dazu wurden 1 %-ige oder 2 %-ige Gele mit SeaKem® LE Agarose (Lonza, Basel, Schweiz) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet und die Proben und ein entsprechender Marker RNA/DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, USA) mittels SYBR® Green I/II (Molecular Probes, Eugene, USA) bei 300 nm UV-Licht visualisiert.

2.1.13 Ribosomen mit naszierender Proteinkette

In vitro lässt sich mRNA von einem Hefesystem translatieren, dem man Energie (ATP, GTP), Aminosäuren und tRNAs zufügt. Anhand des His-Tags der naszierenden Proteinkette lassen sich die RNCs (Ribosome Nascent chain Complexes) affinitätschromatographisch eluieren (vgl. Becker, 2007): Je 4 µg mRNA wurden dazu mit einem Mastermix bestehend aus: 33,2 µl YTE (Hefetranslationsextrakt: freundlicherweise von Dr. Thomas Becker zur Verfügung gestellt,

Becker, 2007), 8 µl 12,5-fachem E-Mix (100 mM ATP, 100 mM GTP (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 500 mM Kreatinphosphat, 8 mg/ml Kreatinphosphatkinase, 10 mg/ml tRNAs (Roche, Basel, Schweiz)), 4 µl 25-fachem Kompensationspuffer (1 M HEPES/KOH pH 7,5, 5 M KOAc, 1 M Mg(OAc)₂, 1 M DTT), 4 µl 5 mM Aminosäuremix (Promega, Madison, USA), 2 µl ANTI-RNase (Ambion, Austin, USA), 4 µl 1 M Tris pH 7 aufgefüllt mit Milli Q Wasser (Millipore, Billerica, USA) bei 17 °C für 75 min zur Translation gebracht. Jede Reaktion wurde mit 2 µl 10 mg/ml Cycloheximid gestoppt. Je zwei Ansätze mit 200 µl wurden durch ein 800 µl Hochsalz-Saccharosekissen (50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 M Saccharose, 10 µg/ml Cycloheximid, 0,1 % Nikkol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,1 % 1 Pille/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) für 45 min bei 4 °C bei 100000 U/min in einem TLA 100.2 Rotor in einer Beckman TL 100 tabletop Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Brea, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und die Ribosomenpellets für 45 min in 500 µl 250-er Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7, 250 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 250 mM Saccharose, 10 µg/ml Cycloheximid, 0,1 % Nikkol, 0,1 % 1 Pille/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail, 0,2 U/ml ANTI-RNase) resuspendiert.

Je 1500 µl 50 %-iger TALON[®] Metal Affinity Resin Slurry (Clontech, Mountain View, USA) wurde mit 5 ml 250-er Puffer mit tRNA (250er Puffer, 10 µg/ml tRNA) bei Raumtemperatur äquilibriert. 1 ml Ribosomen in 250-er Puffer wurden für 5 min an das TALON-Material in den Poly-Prep Chromatographie Säulen (Bio-Rad, Hercules, USA) gebunden. Der Durchfluss wurde gesammelt und jede Säule erst mit 8 ml 250-er Puffer und dann mit 2 ml 500-er Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7, 500 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 250 mM Saccharose, 10 µg/ml Cycloheximid, 0,1 % Nikkol, 0,1 % 1 Pille/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail) gewaschen. Für 5 min wurden die Säulen mit 250-er Puffer mit Imidazol (250-er Puffer, 100 mM pH 7 Imidazol) inkubiert und mit weiteren je 1,5 ml 250-er Puffer mit Imidazol eluiert. Bei 4 °C für 30 min bei 100000 U/min in einem TLA 100.3 (Beckman) wurden die eluierten RNCs durch je 400 µl Saccharosekissen zentrifugiert, der Überstand schnell abgezogen und die Pellets in je 20 µl Gridpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7, 50 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 125 mM Saccharose, 100 µg/ml Cycloheximid, 0,05 % Nikkol, 0,5 % Pille/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail, 0,2 U/µl ANTI-RNase) aufgenommen. Die Lagerung erfolgte nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff dann bei -80 °C.

2.1.14 Gridvorbereitung

Grids (löchriger Kohlefilm auf Kupfernetzchen) werden mit einer dünnen Kohleschicht belegt und durch Plasmaionisation hydrophil für die Probe eingestellt. Mit Chloroform gereinigte QUANTIFOIL® R 2/4 Grids (Quantifoil, Jena, Deutschland) wurden mit dünnem Kohlefilm wie folgt belegt: Mittels eines Bench Top Turbo IV –Table Top High Vacuum Thin Film Deposition System (DentonVacuum, Moorestown, USA) bei $5 \cdot 10^{-6}$ Torr wurden Glimmerplättchen (Mica: Plano, Wetzlar, Deutschland) mit einer dünnen Kohleschicht bedampft, diese dann in Milli Q Wasser (Millipore, Billerica, USA) flотиert und damit die Kupferseiten der Grids belegt. Die getrockneten Grids wurden vor Auftrag der hydrophilen Probe in einem PDC-002 Plasma Cleaner (Harrick Plasma, Ithaca, USA) bei 0,3 mbar für 30 bis 45 s ab Erreichen des Plasmas ionisiert.

2.1.15 Negative Stain Grids

Durch Kontrastierungsmittel erhält man die Konturen der applizierten Proben: 4 µl Probe wurden für 15 s mit dem Grid inkubiert, mit 5 Tropfen Milli Q Wasser (Millipore, Billerica, USA) gespült und mit 4 Tropfen 1 %-iger Uranylacetatlösung oder 0,25 %-iger Methyl-aminowolframat (MAT) oder NanoVan® (Nanoprobes, Yaphank, USA) kontrastiert. Nach dem Abblotten des überschüssigen Kontrastierungsmittels lässt man die Grids trocknen.

2.1.16 Kryo-Negative Stain Grids

Diese Vorgehensweise vermindert mögliche Trocknungsartefakte: Hierbei wurden Negative Stain Grids lediglich für 2 bis 5 min trocknen gelassen, dann in flüssigem Ethan bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ schockgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.17 Kryo Grids

Kryo-EM Proben werden durch die hohe Wärmeleitfähigkeit des flüssigen Ethans unter kontrollierten Bedingungen vitrifiziert: 3,5 µl Probe mit 2 A₂₆₀/ml RNCs wurden im Vitrobot (FEI Company, Oregon, USA) bei 6 °C in 100 % Luftfeuchte für 45 s mit dem Grid inkubiert und nach 7,5 s Blotzeit in flüssigem Ethan bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ schockgefroren und abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert (Wagenknecht *et al.*, 1988).

2.1.18 Kontroll-TEM

Negative Stain Grids (vgl. 2.1.15) zur Kontrolle oder Übersicht wurden in einem FEI Morgagni 268 (FEI Company, Oregon, USA) bei 40000-facher oder 60000-facher Vergrößerung begutachtet.

2.1.19 TEM Aufnahme und Scannen

Die Negative Stain Proben wurden am Philips Tecnai F20 (FEI Company, Oregon, USA) mit Feldemissionskathode bei 160 kV bei 65473-facher Vergrößerung am FZEM der FU Berlin unter Kryobedingungen, die Kryo-EM Proben hingegen am Tecnai G2 Polara F30 (FEI Company, Oregon, USA) mit FEG bei 300 kV bei nominal 39000-facher Vergrößerung am MPI-MG Berlin jeweils unter Niedrigdosisbedingungen von 25 Elektronen/Å²/s (0,75 s Belichtungszeit) auf Kodak Electron Image Film SO-163 (Eastman Kodak, Rochester, USA) aufgenommen. Digitalisiert wurden die Mikrografen auf einem Trommelscanner Primscan D8000 (Heidelberger Druckmaschinen, Heidelberg, Deutschland) am MPI-MG Berlin bei 5334 dpi oder 4000 dpi und 16 bit Datentiefe.

2.2 Datenprozessierung

Die TEM Datenprozessierung (vgl. 1.2) erfolgte mit dem Softwarepaket SPIDER&WEB (Frank *et al.*, 1996; Shaikh *et al.*, 2008; http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/spider.html).

Man kann sowohl interaktiv als auch mittels einer einfachen Skriptsprache für zeitaufwendige, umfangreiche automatische Prozessierung die Datensätze bearbeiten. Das Selektieren der geeigneten guten Partikel als auch die Bestimmung der Defokuswerte anhand der Thonringe fand interaktiv in WEB statt. Die Analyse der Partikel zur Berechnung der 3D-Rekonstruktion erfolgte durch Skripting.

2.2.1 Kryo-EM Einzelpartikel Rekonstruktion

Mittels eines schnellen lokalen Korrelationsalgorithmus durch Fouriertransformation (Roseman, 2003) wurden auf den 20-fach verkleinerten Mikrographen in den maskierten Löchern der aufgenommenen Grids automatisch Partikel anhand einer 3D-Referenz gefunden. Die Positivselektion erfolgte visuell interaktiv. Durch Projection Matching (vgl. 1.2.3, Abbildung 16) ließen sich bei 83 CTF-angepassten Referenzprojektionen (15° Winkelschrittweite) die Partikel bei $3,26 \text{ \AA}/\text{Pixel}$ mit 138×138 Pixel Größe mittels AP MQ Alignierung durch Shift und Rotation mit 15 Pixeln Suchweite und einem äußeren Partikelradius von 44 Pixeln anhand der Kreuzkorrelationskoeffizienten initial zuordnen. Die mit TF C3 (Transfer function - complex 3D) CTF-korrigierte und mittels BP 32F im Fourierraum rückprojizierte 3D-Struktur wurde einem Refinement und einer Sortierung wie folgt unterworfen: iterativ dient dabei jede neu berechnete 3D-Struktur als Referenz für die nächste Runde des verfeinerten Partikelabgleichs mittels AP MD (Alignment - Multi reference, Rotation) zur genaueren Bestimmung des Rotationswinkels, mittels AP RQ (Alignment - Multi-reference, Shift, restricted Projections) zur präziseren Suchweitenbestimmung bei beschränkter Anzahl an Referenzprojektionen, mittels AP RN (Alignment - Multi-reference, restricted Projections, no Mirror check) zum schnellen Abgleich bei beschränkter Winkelsuche mit beschränkten Referenzprojektionen. Zur Sortierung wurden die Partikel jeweils mit zwei verschiedenen Referenzrekonstruktionen verglichen und der Datensatz somit getrennt. Der Teil des Datensatzes mit der gesuchten Struktur wurde dann noch einem Refinement bei $2,45 \text{ \AA}/\text{Pixel}$ unterzogen. Die finale 3D-Rekonstruktion wurde mit dem qualitativ besseren BP RP Befehl erreicht. Zur Bestimmung der Auflösung wurden zwei Halbdatsatz-3D-Strukturen berechnet und diese anhand des Vergleichs durch Fourier-Shell-Correlation (FSC) von 0,5 mittels der Raumfrequenz ermittelt.

2.2.2 Common Lines Rekonstruktion

Analog der Kryo-EM Einzelpartikel Rekonstruktion wurden automatisch Partikel bestimmt. Als Referenz diente ein Ball mit 40 Pixeln Durchmesser bei 2,9 Å/Pixel. Eine Referenz-freie Alignierung wurde mittels AP SR für Shift und Rotation durchgeführt. Die Partikel wurden mit RT SQ rotiert, mittels AP CA (Alignment - Classification and Alignment) wurden mehrere Klassendurchschnitte berechnet und diese mittels AS R (average Images - find & save Variance) erhalten.

Anhand von je 3 bis 4 gewählten Klassendurchschnitten wurden mit Hilfe zufällig generierter Eulerwinkel die relative Orientierung mittels OP (Orientation of Projections in Terms of Eulerian angles) bei 35 Pixel Länge der 1D-Projektionslinie (der „*common line*“) bestimmt und eine BP 32F Initialrekonstruktion berechnet. Nachdem eine geeignete Startrekonstruktion gefunden wurde, erfolgte ein AP MQ (Alignment - Multi-reference, Shift & Rotation) Refinement. Die Auflösung ermittelte sich wie bei der Kryo-EM Einzelpartikel Rekonstruktion (vgl. 2.2.1).

2.2.3 Random Conical Tilt Rekonstruktion

Die ungekippten (untilted) und die gekippten (tilted) Partikel wurden in WEB manuell paarweise selektiert und die Winkel zwischen den beiden Aufnahmen bestimmt, wobei eine qualitative Nachselektion erfolgte. Mittels referenzfreier Alignierung AP SR (Alignment - Reference free, Shift & Rotation) konnten die Rotationen und Shifts der ungetilteten Partikel bestimmt und angewandt (RT SQ: rotate and shift - Image, quadratic Interpolation) werden. Durch Korrespondenzanalyse wurden ähnliche Partikel Clustern zugeordnet: mit CA SI (Correspondence analysis - initialize) initialisierte man für das Finden der Faktoren durch CA S (Correspondence analysis - Solution), um durch hierarchisches Clustern CL HC (komplett verbunden) bei einem Schwellwert von 0,9 mittels CL HD (Classification - hierarchical, get number of Classes)/CL HE (Classification - hierarchical, create Cluster selection files) die Partikelcluster zu gruppieren. Anhand der Winkel ließ sich für jeden Cluster, d.h. für jede unterschiedliche Partikelorientierung, aus den getilteten Partikeln eine vorläufige Subrekonstruktion mittels BP 3F (Back projection - 3D, interpolated in Fourier space) erstellen und refinieren (analog der Kryo-EM Einzelpartikel Rekonstruktion, 2.2.1). Die Artefakt-freien Subrekonstruktionen wurden zusammengeführt und die Gesamtrekonstruktion mittels BP RP (Back projection - 3D, iterative, with Constraints) wie zuvor refined.

2.2.4 Negative Stain Rekonstruktion

Der Common Lines Datensatz wurde mit dem auf 2,9 Å/Pixel angepassten Random Conical Tilt Datensatz (4 Å/Pixel) vereint und ein AP MQ Refinement durchgeführt.

2.2.5 Visualisierung und Docking

Die Maskierung zur Referenzerzeugung und Auftrennung in Untereinheiten nebst Liganden erfolgte mittels des IRIS ExplorerTM (Numerical Algorithms Group, Oxford, UK) ebenso die initiale Bestimmung der bindenden rRNA sowie der bindenden ribosomalen Proteine im Homologiemodell (Beckmann *et al.*, 2001, Spahn *et al.*, 2001). Analyse, Docking bzw. das Zusammenfügen der Elektronendichtemaps (Kryo-EM), Konturmaps (Negative Stain), Kristallographiemodelle (PDBs) und die Erstellung der Abbildungen erfolgte mittels UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004): <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>.

3 Ergebnisse

3.1 Ribosomen-assoziierte Membranproteine

Mit Ribosomen assoziierte Membranproteine (RAMPs), die durch das milde Detergens Digitonin solubilisiert werden, komigrieren unter Niedrigsalzbedingungen im Dichtezentrifugationsgradienten (vgl. 2.1.4) mit den gebundenen 80S-Ribosomen. Unassoziierte Membranproteine verbleiben aufgrund ihres niedrigeren Molekulargewichtes in der Topfraktion, während Aggregate unter diesen Bedingungen zu Boden sinken. Durch Flotieren (2.1.3) von ER-Membranvesikeln, den Mikrosomen verschiedener Stämme, die jeweils ein Protein A-getaggttes Membranprotein exprimierten (Sec61p-proA, Sec62p-proA, Wbp1p-proA; vgl. Tabelle 1, 2.1.1), konnten ER-gebundene Ribosomen mit den assoziierten Membranen isoliert werden.

In *Saccharomyces cerevisiae* lässt sich mit zum Vergleich aufgetragenen 80S-Ribosomen (vgl. 2.1.8) feststellen, dass wie erwartet ein Teil des Sec61p-proA in der Ribosomenfraktion zu finden ist, was bedeutet, dass der kotranslational agierende Anteil an Sec61p also ein RAMP sein muss. Zum Nachweis wurden die durch SDS-PAGE (vgl. 2.1.10) aufgetrennten Proteine durch Western-Blot und Amidoschwarzfärbung sichtbar gemacht (vgl. 2.1.10) und anschließend die Protein A-getaggtten Proteine durch Antikörperinkubation mittels ECL-Reaktion (vgl. 2.1.10) identifiziert (Abbildung 18).

Sec62p als Bestandteil des für den posttranslationalen Proteintransport verantwortlichen heptameren Sec-Komplexes (Panzner *et al.*, 1995) ist wie bekannt kein RAMP.

Die essentielle Untereinheit Wbp1p (te Heesen *et al.*, 1992) der Oligosaccharyltransferase (OST) findet sich wie Sec61p zum Teil mit den Ribosomen assoziiert. Andere Untereinheiten der OST sollten somit folgerichtig auch RAMPs sein.

Damit liegt die Annahme nahe, dass die OST mit Sec61 und Ribosomen *in vivo* im Komplex vorliegt.

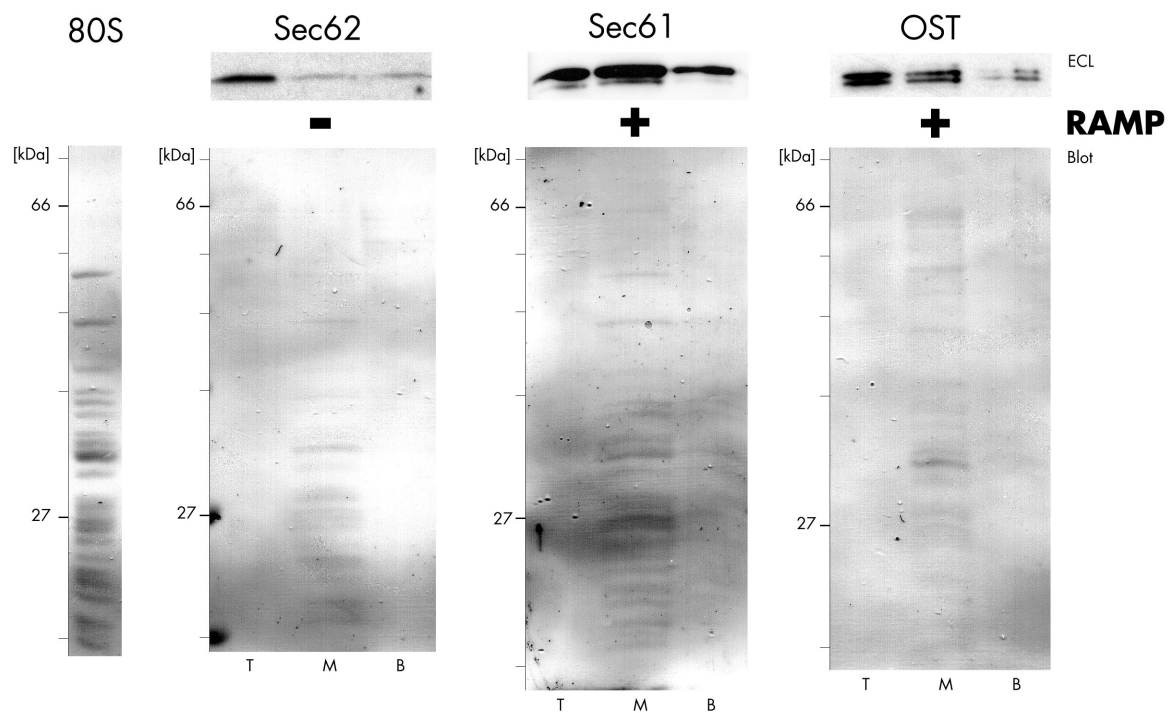


Abbildung 18: RAMP (vgl. 2.1.4): Ribosomen-assoziierte-Membranproteine (+, RAMPs) finden sich in den mittleren, den Ribosomen enthaltenden Fraktionen (M) der Dichtegradientenzentrifugationsprofile der solubilisierten flotierten Mikrosomen. Durch ECL-Reaktion lässt sich der Protein A-Tag des entsprechend markierten Proteins identifizieren: Sec62p (Sec62), Sec61p (Sec61), Wbp1p (OST). Nicht mit Ribosomen assoziierte Membranproteine (-, RAMP) verbleiben in der Topfraktion (T), Aggregate finden sich am Boden (B). Zum Vergleich sind geblottete Ribosomen (80S) aufgetragen.

3.2 Präparation und Charakterisierung

Für eine *in vitro* Rekonstitution des postulierten trimeren OST-Sec61-Ribosom-Komplexes zur anschließenden Strukturaufklärung mittels Kryo-Elektronenmikroskopie mussten zunächst die Einzelkomponenten isoliert und gereinigt werden.

Darauf folgend wurden die Rekonstitutionsbedingungen eruiert, d.h. es wurde qualitativ die Bindung des Sec61-Komplexes und/oder der OST an 80S-Ribosomen untersucht und es wurden die Parameter zur Sättigung der OST an den dimeren Sec61-Ribosom-Komplex bestimmt.

3.2.1 Die Oligosaccharyltransferase

Zuerst erfolgte eine immuno-affinitätschromatographische Isolation der an Wbp1p getaggten Oligosaccharyltransferase (OST). Für die zweite Stufe der Reinigung an Q-Sepharose wurde dann das Protokoll von Kelleher und Gilmore (Kelleher und Gilmore, 1994) modifiziert (vgl. 2.1.6).

Der genutzte Stamm OST 3X-4 wuchs gut bis zu einer Dichte von $6,2 A_{600}/\text{ml}$ (vgl. 2.1.1), was eine Menge von 350 g pelletierter Zellen bei 20 l Ansatzgröße ergab.

Gegenüber der French Press war der Zellaufschluss mittels des Hochdruckhomegenisators (vgl. 2.1.2) bereits im 1-stufigen Durchgang zu 100 % erfolgreich. Nach Zentrifugationen und abschließender Aufnahme in Puffer konnten 50 ml Mikrosomensuspension einer Dichte von $A_{280} = 250$ gewonnen werden (vgl. 2.1.2).

In 2 % des milden Detergens Digitonin ließen sich bis zu $30 A_{280}/\text{ml}$ Mikrosomensuspension in Lösung bringen. Bei einem Ansatz von 240 ml band die gesamte OST an 2,4 ml IgG-Sepharose (vgl. 2.1.5) und wurde unter den beschriebenen Bedingungen (vgl. 2.1.6) vollständig durch den Faktor Xa-Verdau vom Protein A-Tag getrennt. Die erhaltene OST weist bis zu 10 % vermutlich vor allem ribosomaler Verunreinigungen auf (Abbildung 19).

Mit 125 mM Saccharose anstelle von 20 % Glycerol und unter Verwendung von KCl anstatt von NaCl (vgl. Kelleher und Gilmore, 1994) konnten in einem zweiten Reinigungsschritt an Q-Sepharose (vgl. 2.1.6) die Fraktionen 3 und 4 vereinigt und dialysiert werden (Abbildung 19).

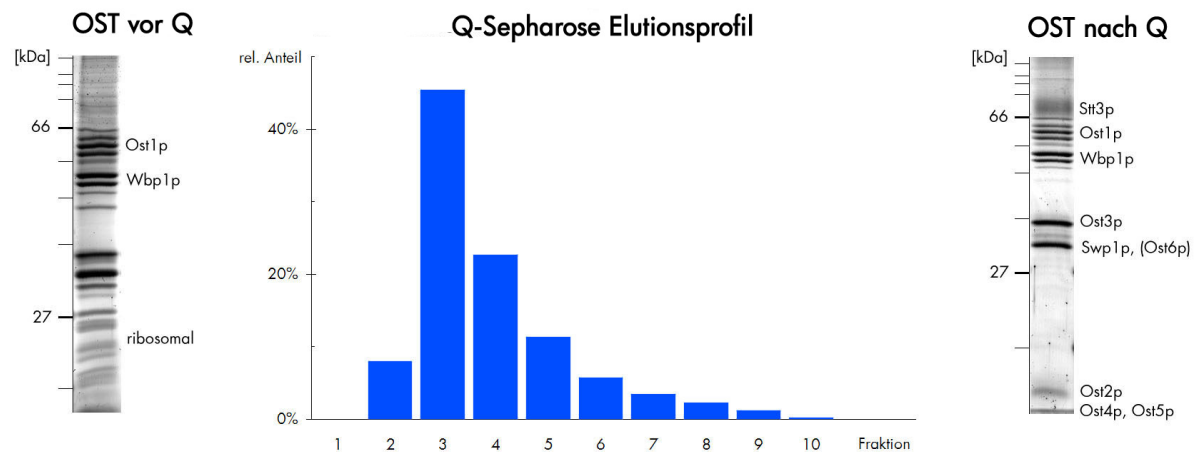


Abbildung 19: OST Präparation (vgl. 2.1.6): Gewinnung der OST mit ca. 10 % Verunreinigungen (OST vor Q), dann Reinigung über Q-Sepharose und anschließende Dialyse der vereinigten Fraktionen 3 und 4 zur OST ohne sichtbare Verunreinigungen (OST nach Q): Auf den SDS-PAGE-Gelen kann man Verunreinigungen vermutlich durch ribosomale Proteine (ribosomal) in der OST vor Q neben den charakteristischen Multipletts, aufgrund der Mehrfach-Glykosylierung von Ost1p und Wbp1p sehen. Stt3p läuft atypisch als verbreiterte Bande. Ost3p, Swp1p, Ost6p, Ost2p, Ost4p, Ost5p können aufgrund ihres Molekulargewichts zugeordnet werden.

Durch Konzentrationsbestimmung (2.1.10) und anhand der gemessenen Volumina ließ sich berechnen, dass eine 330-fache Anreicherung der solubilisierten OST erreicht werden konnte. Aus 20 l Hefeansatz bei 6,2 A_{600}/ml wurden 141 μg (0,5 nmol) OST gewonnen.

3.2.2 Der Sec61-Komplex

Die zweistufige Aufreinigung des trimeren Sec61-Komplexes zunächst durch eine Elution aus dem heptameren Sec63-Komplex mit dem Detergens Triton X-100 und einer anschließenden Umpufferung auf ein milderes Detergens an SP-Sepharose ist sehr gut nachvollziehbar (Beckmann *et al.*, 2001).

Der verwendete Stamm Sec63XA ließ sich problemlos bis zu einer Dichte von 9,5 A_{600}/ml heranziehen (vgl. 2.1.1), was einer Menge von 519 g kompakter Zellen bei 20 l Ansatzgröße entsprach.

Nach dem Zellaufschluss mittels des Hochdruckhomogenisators wurden durch Zentrifugationen und anschließender Aufnahme in Puffer 72 ml Mikrosomensuspension einer Dichte von $A_{280} = 557$ gewonnen (vgl. 2.1.2).

Bei den gewählten Solubilisationsbedingungen von 30 A₂₈₀/ml Mikrosomen in 2 % Digitonin konnte der Sec63-Komplex vollständig in Lösung gebracht werden (vgl. 2.1.7). An auf die Ansatzgröße bezogen 1 % IgG-Sepharose (vgl. 2.1.5) gebunden, wurde der Sec61-Komplex (Abbildung 20) erschöpfend mit Triton X-100 gewonnen. Die Probe enthält noch geschätzte 5 % an Verunreinigungen, vermutlich durch ribosomale Proteine.

Darauf erfolgte die Umpufferung auf 0,125 % Digitonin und die Reinigung an SP-Sepharose (vgl. 2.1.7). Die höchstkonzentrierten Fraktionen (2, 3) wurden vereinigt (Abbildung 20). Einzig sichtbare Beimengung sind Spuren von eEF1 α p (vgl. Becker, 2007).

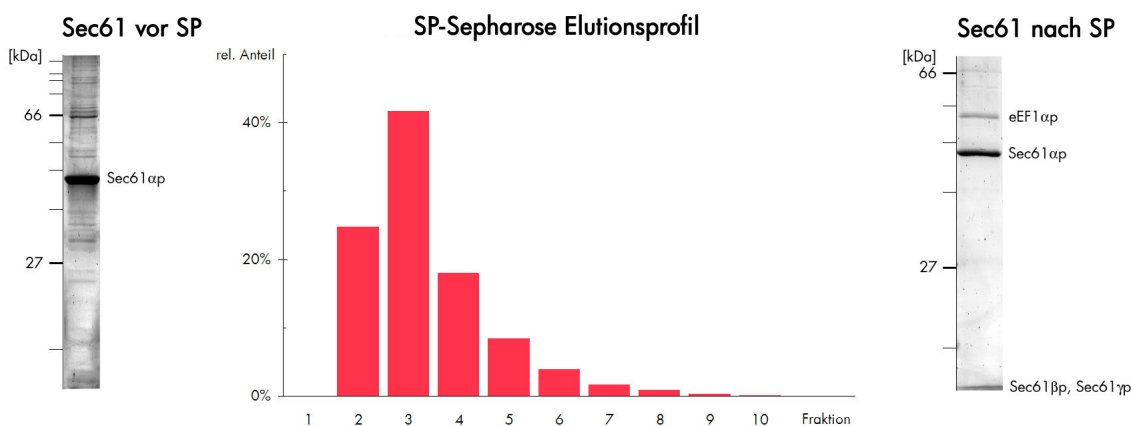


Abbildung 20: Sec61 Präparation (vgl. 2.1.7): Gewinnung des Sec61-Komplexes mit ca. 5 % Verunreinigungen (Sec61 vor SP), dann Reinigung sowie Umpufferung über SP-Sepharose und anschließende Dialyse der vereinigten Fraktionen 2 und 3 zum Sec61-Komplex (Sec61 nach SP) mit einer Präparations-spezifischen Beimengung an eEF1 α p (Daten aus SDS-PAGE).

Durch Konzentrationsbestimmung (2.1.10) und anhand der gemessenen Volumina ließ sich berechnen, dass eine 325-fache Anreicherung des solubilisierten Sec61-Komplexes erreicht werden konnte. Aus 20 l Hefeansatz (9,5 A₆₀₀/ml) wurden 470 μ g (6,5 nmol) Sec61-Komplex gewonnen.

3.2.3 80S Ribosomen und Ribosomen mit naszierender Proteinkette

Aus den zytosolischen S100-Extrakten (vgl. 2.1.2) lassen sich die 80S-Ribosomen durch ein Hochsalz-Saccharosekissen pelletieren (vgl. 2.1.8), um sie von unspezifisch anhaftenden Proteinen zu befreien. Nach dieser Vorgehensweise konnten Ribosomen einer Konzentration von 3,1 nmol/ml gewonnen werden. Die folgende Auftrennung und Isolation des 80S-Peaks der Dichtegradientenzentrifugation, der ausgezeichnet sichtbar im Streulicht des

Gradientenfractionierers ist (vgl. 2.1.8), resultierte in 80S-Ribosomen einer Konzentration von 82 pmol/ml. Nach der abschließenden Sedimentierung und Wiederaufnahme in Puffer lag die Konzentration der 80S-Ribosomen (Abbildung 21) bei 4,9 nmol/ml.

Ribosomen mit naszierender Proteinkette, RNCs (Ribosome Nascent chain Complexes), waren nach einem verbesserten Protokoll (Becker, 2007) zugänglich (vgl. 2.1.13). Zunächst konnte mittels eines *in vitro* Transskriptionssystems (vgl. 2.1.11) 30 µl gecappte mRNA des trunkierten (d.h. DNA ohne Stoppcodon) His-HA-DPAP-B-120-DNA-Templats einer Konzentration von 4,2 µg/ml erzeugt werden. Ribosomen des Hefetranslationsextraktes (vgl. 2.1.13) synthetisierten daraus die ersten 120 N-terminalen Aminosäuren des Typ II Membranproteins Dipeptidylpeptidase B versehen mit einem N-terminalen His-HA-Tag. Die naszierende Proteinkette verblieb dann an der 120. t-RNA in der Peptidylposition gebunden am Ribosom. Diese RNCs konnten Metall-affinitätschromatographisch gereinigt werden (Abbildung 21). Alle Ribosomen der Translationsansätze wurden nach der 75 minütigen Inkubation mit der erzeugten mRNA durch ein Saccharosekissen pelletiert und in je 500 µl Puffer aufgenommen. Daraus resultierte eine Ribosomenkonzentration von 0,54 nmol/ml. Durch Applikation auf eine Kobaltionen-haltige Matrix (siehe 2.1.13) banden daran die Poly-His-Tags der naszierenden Ketten und mit diesen über die Peptidyl-t-RNA assoziierte Ribosomen. Nach der Elution mit Imidazol und der abschließenden Sedimentation wurden die aufgereinigten RNCs in Gridpuffer aufgenommen. Die Konzentration betrug 104 pmol/ml.

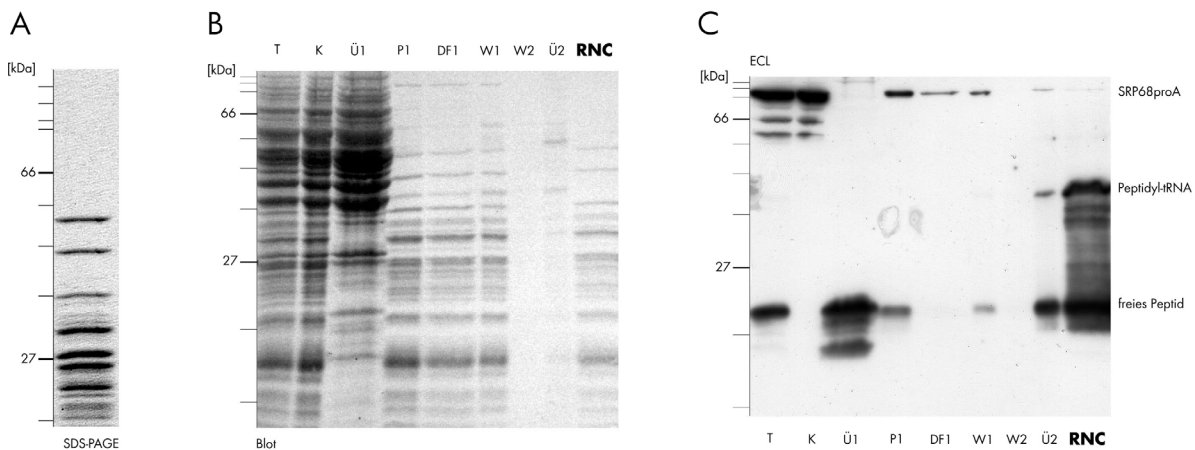


Abbildung 21: RNC Präparation (vgl. 2.1.13): Zum Vergleich sind die SDS-PAGE Bandenmuster gereinigter 80S Ribosomen (A) dargestellt. In C sieht man die korrespondierenden ECL-Signale neben dem mit Amidoschwarz gefärbten Blot (B) der RNC-Präparation (RNC). Ein sauberes ribosomales Bandenmuster (B, RNC) mit hoher ECL Signalintensität (C, RNC) des an die Peptidyl-t-RNA gebundenen His-HA-DP120-Peptids (C, Peptidyl-tRNA) zeigt den Erfolg der Präparation in der Anreicherung gegenüber dem Translationsansatz (T) an. Im Verlauf der Reinigung entfernt man so z.B. das Protein A getaggte Srp68p Protein (C, SRP68proA). Man detektiert desweiteren verschiedene Zersetzungsprodukte bis hin zum freien His-HA-DP120-Peptid (C, freies Peptid). Aufgetragen wurden: 1/400 Translationsansatz (T), 1/25 Kontrolle (K), 1/80 Überstand 1 (Ü1) der ersten Ribosomensedimentierung, dazugehörig 1/400 Pellet 1 (P1), 1/300 Durchfluss 1 (DF1) nach dem Binden an das Säulenmaterial, 1/10 Waschfraktion 1 (W1), 1/10 Waschfraktion 2 (W2), 1/10 Überstand (Ü2) nach der abschließenden Ribosomenpelletierung, hierzu 1/5 der RNC-Präparation (RNC).

3.2.4 Bindung und Sättigung

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen zu den mit Ribosomen *in vivo* assoziierten Membranproteinen (vgl. 3.1) wurden nun 80S-Ribosomen mit den RAMPs enthaltenden Komplexen der OST und dem Sec61-Komplex zu dimeren/trimeren Komplexen *in vitro* rekonstituiert. Anhand der Komigration mit den Ribosomen im Dichtezentrifugationsgradienten ließen sie sich qualitativ hinsichtlich ihrer Bindung begutachten.

Ein ohne Bindungspartner aufgetragener Sec61-Komplex mit 72 kDa und die ohne Bindungspartner aufgetragene OST mit 282 kDa verblieben wie erwartet jeweils in den Topfraktionen. 80S-Ribosomen allein fanden sich in den Mittelfractionen (Abbildung 22). Wurden der Sec61-Komplex oder die OST mit Ribosomen inkubiert, ließen sich der bekannte 80S-Sec61-Komplex (vgl. 1.1.1) aber auch der 80S-OST-Komplex (vgl. 1.1.2) finden. Überschüssiger Sec61-Komplex als auch überschüssige OST konnten ungebunden detektiert

werden, was auf eine spezifische Bindung der beiden ribosomalen Liganden schließen lässt. Der für diese Arbeit relevante 80S-Sec61-OST-Komplex ließ sich ebenso erfolgreich rekonstituieren.

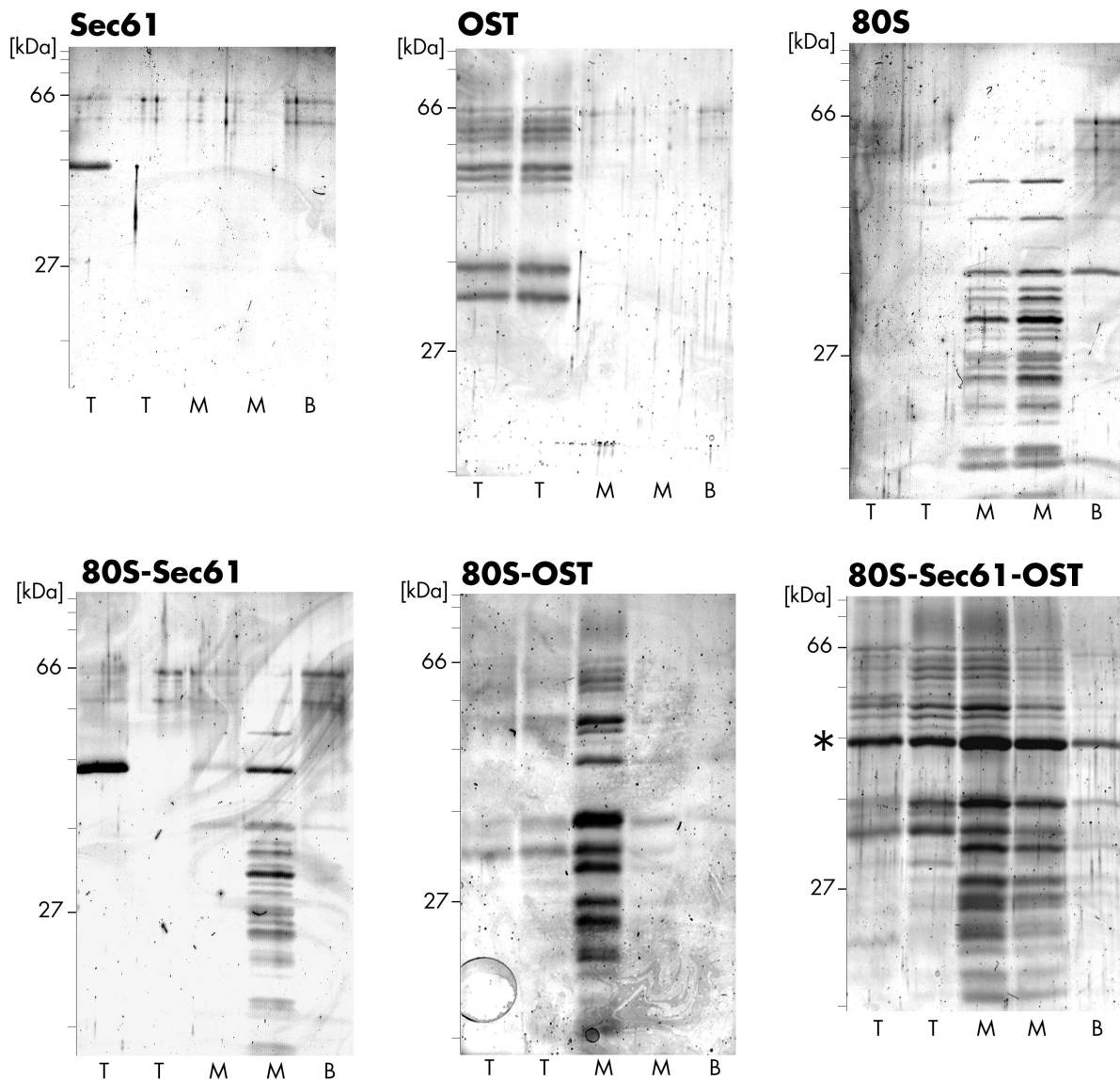


Abbildung 22: Bindungstests durch Analyse mittels Dichtegradientenzentrifugation: der zur Kontrolle aufgetragene Sec61-Komplex (Sec61) verblieb in den Topfraktionen (T), ebenso verblieb die zur Kontrolle aufgetragene Oligosaccharyltransferase (OST) in den Topfraktionen, zur Kontrolle aufgetragene Ribosomen (80S) wanderten in die Mittelfraktionen (M). Der Gebildete Ribosom-Sec61-Komplex (80S-Sec61) befand sich mit den Ribosomen in M, überschüssiger Sec61 verblieb oben (T). Für den Ribosom-OST-Komplex ließ sich Analoges feststellen – ungebundene OST wurde in T gefunden, im Komplex gebundene mit den Ribosomen in M. Der trimere 80S-Sec61-OST-Komplex befand sich ebenso in M, sowohl bei ungebundenem überschüssigem Sec61 (*) als auch bei ungebundener überschüssiger OST in T. Dargestellt sind die mit SYPRO® Orange gefärbten SDS-PAGE-Gele (vgl. 2.1.10).

Im Folgenden wurde die Sättigbarkeit des OST-(Sec61-80S-Ribosom)-Komplexes bestimmt.

Für den Rezeptor R und den Liganden L, die mit dem Rezeptor-Liganden-Komplex RL im Gleichgewicht vorliegen, lässt sich das Massenwirkungsgesetz wie folgt formulieren:

$$K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad (1).$$

Bezeichnen wir nun den ungebundenen Liganden L als F (Free Ligand), den gebildeten Rezeptor-Liganden-Komplex RL als B (Bound Ligand), so ist der frei im Gleichgewicht vorliegende Rezeptor $[R] = [B_{\max}] - [B]$, weil $[B_{\max}] = [R_{\max}]$ bereits durch den gebundenen Liganden B in der Konzentration um $[B]$ verringert wurde.

Durch das Einsetzen in (1) und das Umformen folgt die Gleichung für den Scatchard-Plot (2) (vgl. Rehm und Letzl, 2010):

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{[B_{\max}]}{K_D} - \frac{[B]}{K_D} \quad (2).$$

Weiteres Umformen führt zur Gleichung für die Bindungskurve:

$$[B] = \frac{[F] \cdot [B_{\max}]}{K_D + [F]} \quad (3).$$

Die Bindungstests (vgl. 2.1.9) der OST an Sec61-80S-Ribosomen-Komplexe konnten bei verschiedenen Konzentrationen an OST zur Bestimmung des Sättigungsverhaltens genutzt werden.

Unter gleichen Bedingungen (bzgl. Dichtegradient, Zentrifugationsdauer) sedimentieren die 80S-Ribosomen konstant. Die entsprechende Fraktion des Gradienten war vorher durch Streulicht mittels des Fraktionierers anhand aufgetragener 80S-Ribosomen bestimmt worden, so dass die geringen Mengen an Ribosomen (1 pmol/Ansatz) auch ohne Zuhilfenahme des Streulichtes gefunden werden konnten (vgl. 2.1.8). Mit SYPRO® Orange gefärbte SDS-PAGE-Gele (vgl. 2.1.10) wiesen optisch auf eine Sättigbarkeit der OST an Sec61-80S-Ribosomen-Komplexe hin (vgl. z.B. Abbildung 22: 80S-OST und 80S-Sec61-OST). Zur Quantifizierung erfolgte die Bestimmung der Bandenintensität anhand der LAU-Werte (Light Absorption Units) 2D-densitometrisch (vgl. 2.1.10). Durch Vergleich mit dem aufgetragenen BSA-Standard und unter Berücksichtigung des Hintergrundrauschens ließen sich die Stoffmengen an OST bestimmen und anhand der Ansatzgrößen die entsprechenden Konzentrationen. Nun erfolgte die Auswertung mittels des Scatchard-Plots. Es konnte eine K_D von 12,8 nM und eine maximale Sättigungskonzentration von 17,4 nM bestimmt werden. In Abbildung 23 ist die Sättigungskurve für den OST-(Sec61-80S-Ribosomen)-Komplex dargestellt.

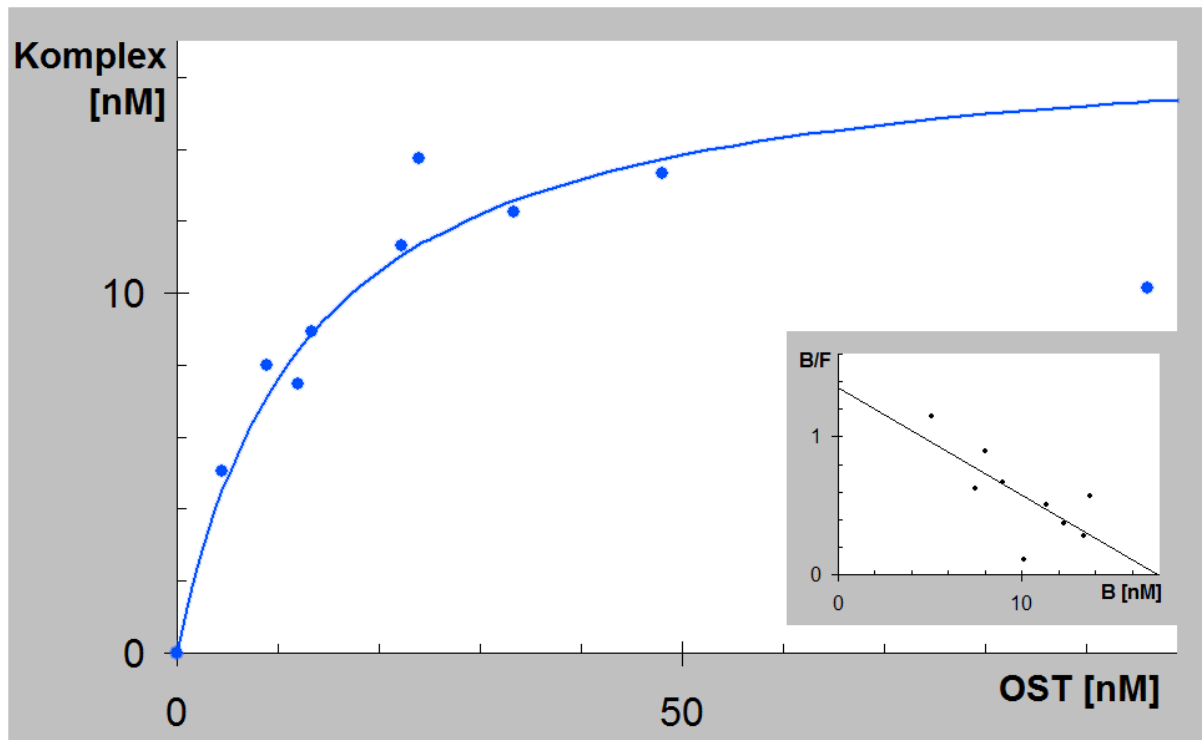


Abbildung 23: Sättigung der OST an Sec61-80S-Ribosomen-Komplexe: Aufgetragen ist die Konzentration von gebildetem OST-(Sec61-80S-Ribosomen)-Komplex über freier OST. Im Fenster sieht man den Scatchard-Plot zur Ermittlung der $K_D = 12,8$ nM und der Maximalsättigung von 17,4 nM.

Diese Daten lassen im untersuchten Bereich auf eine spezifische 1 : 1 Bindung der OST an die Sec61-80S-Ribosomen-Komplexe schließen ($n = 1,1$ pmol : 1 pmol). Es kann hier nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die OST bei sehr hohen Konzentrationen (für 96 nM OST nur 10,1 nM Komplex, siehe Abbildung 23) dimerisiert (vgl. Chavan *et al.*, 2006) und somit ein Konkurrenzgleichgewicht zur Komplexbildung (hier: $n = 1,2$) vorliegt.

3.3 Struktur der Oligosaccharyltransferase

Um weitergehende Aussagen zum OST-Sec61-Translokon treffen zu können, ist eine Kryo-Negative Stain 3D-Rekonstruktion der OST angefertigt worden. Es gelang mittels Random Conical Tilt und Common Lines Rekonstruktion eine Gesamtstruktur der OST zu bestimmen, die durch Docking des Stt3p-Homologs PglB bestätigt wurde und zu einem damit sehr aussagekräftigen Hybridmodell vereinigt werden konnte.

3.3.1 Homogenität und Kontrastierung

Bevor die Negative Stain Aufnahmen der OST gemacht werden konnten, war es erforderlich, die Homogenität der Probe zu bestimmen. Dazu musste zunächst ein hierfür geeignetes Kontrastierungsmittel ausgewählt werden. Das bekannteste Kontrastierungsmittel Uranylacetat (1%-ige Lösung, vgl. 2.1.15) ergab den besten Kontrast. Die OST-Probe verteilte sich gleichmäßig in guter Dichte auf dem Grid. Im Kontroll-TEM (vgl. 2.1.18) sind charakteristisch dreieckförmige Partikel leicht erkennbar (Abbildung 24). Mit Methylaminowolframatlösung (0,25 %-ig MAT, vgl. 2.1.15) ergab sich ein signifikanter Kontrast. Die Dichte der Probe war identisch. Auch hier ließen sich die charakteristisch dreieckförmigen Partikel erkennen. NanoVan brachte den bei gleicher Dichte im Vergleich schwächsten Kontrast, zeigte aber auch die gleiche äußere Form der OST wie zuvor.

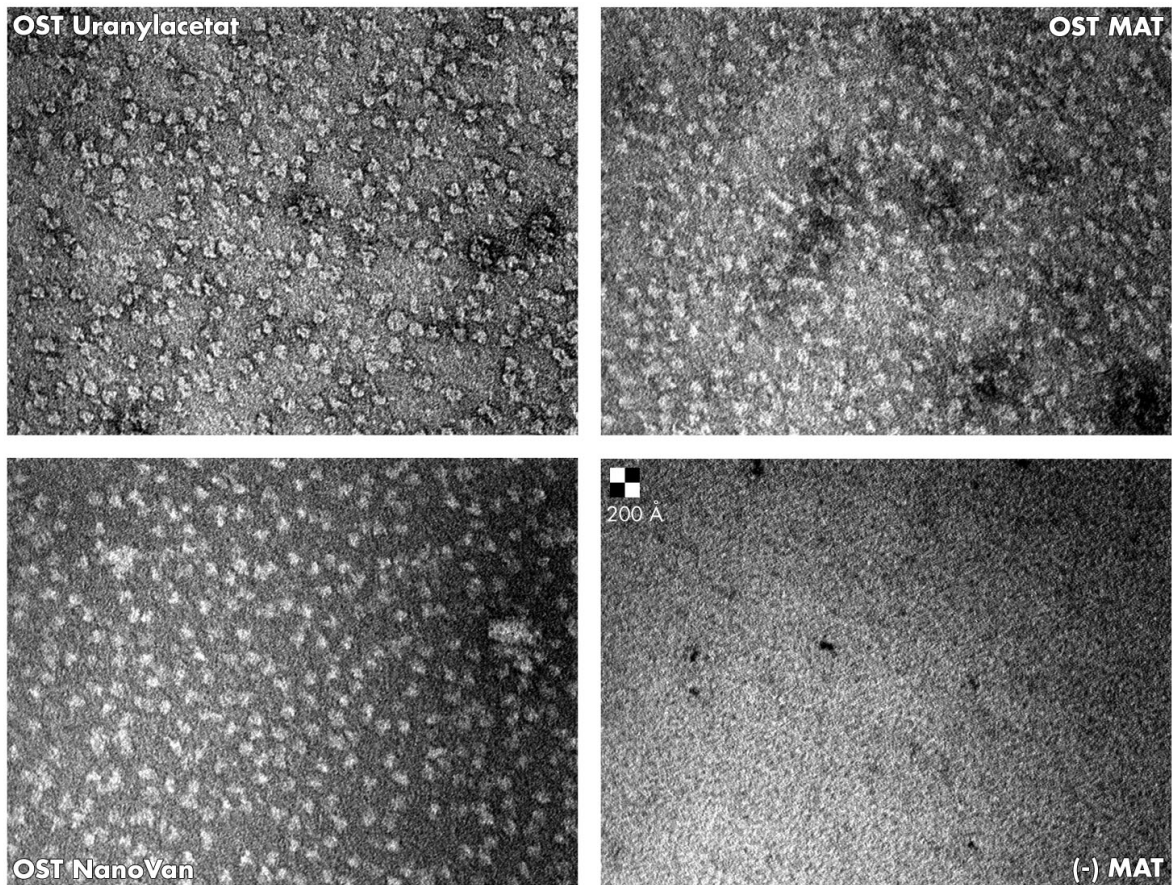


Abbildung 24: Übersichts-TEM der OST-Probe bei absteigendem Kontrast (vgl. 2.1.15): 1 %-ige Uranylacetatlösung, 0,25 %-ige Methylaminowolframatlösung (MAT), NanoVan-Lösung und zum Vergleich eine Aufnahme ohne Probe (-); 200 Å Maßstabsquadrat.

Die OST-Probe wies ein insgesamt sehr homogenes für die 3D-Strukturbestimmung geeignetes Aussehen auf. Der Partikeldurchmesser liegt in der Größenordnung von 100 Å.

3.3.2 Random Conical Tilt Struktur

Für die Kippserienrekonstruktion (Random Conical Tilt, RCT) wurde die Dichte der applizierten OST-Probe auf 20 ng/μl verringert, um die optisch gedrängteren Partikel auf den gekippten Aufnahmen noch unterscheiden zu können. Die Kryo-Negative Stain Grids (mittels dieser Hybridtechnik wurden Trocknungsartefakte verringert, vgl. 2.1.16) sind mit dem weniger harte Kontraste erzeugenden MAT-Stain angefertigt worden.

Von den Mikrografen (vgl. 2.1.19) ließen sich 1554 Partikelpaare (d.h. jeweils der ungekippte und der korrespondierende gekippte Partikel) isolieren. Die Berechnung erfolgte bei 4 Å/Pixel.

Der zur Bestimmung der Orientierung durch Shift und Rotation aller übereinandergelegten ungekippten Partikel erzeugte Globaldurchschnitt (Abbildung 25; vgl. 2.2.3) zeigt den charakteristisch dreieckförmigen Umriss der Einzelpartikel der OST.

Mittels Korrespondenzanalyse wurden die bei 40 Å filtrierte Partikel bei einem Maskendurchmesser von 40 Pixeln absteigend hierarchisch klassifiziert und zu Clustern ähnlicher Partikelorientierung zusammengefasst (Abbildung 25; vgl. 2.2.3). Bei dem Schwellwert von 0,9, um möglichst viele verschiedene Partikelgruppen zu finden, ließen sich 19 Klassendurchschnitte dieser Cluster berechnen, wobei drei Cluster bereits deutlich zu wenige Partikel enthielten. Zwei Ecken der Partikel in den Klassen blieben nahezu konstant, die dritte Ecke war variabel.

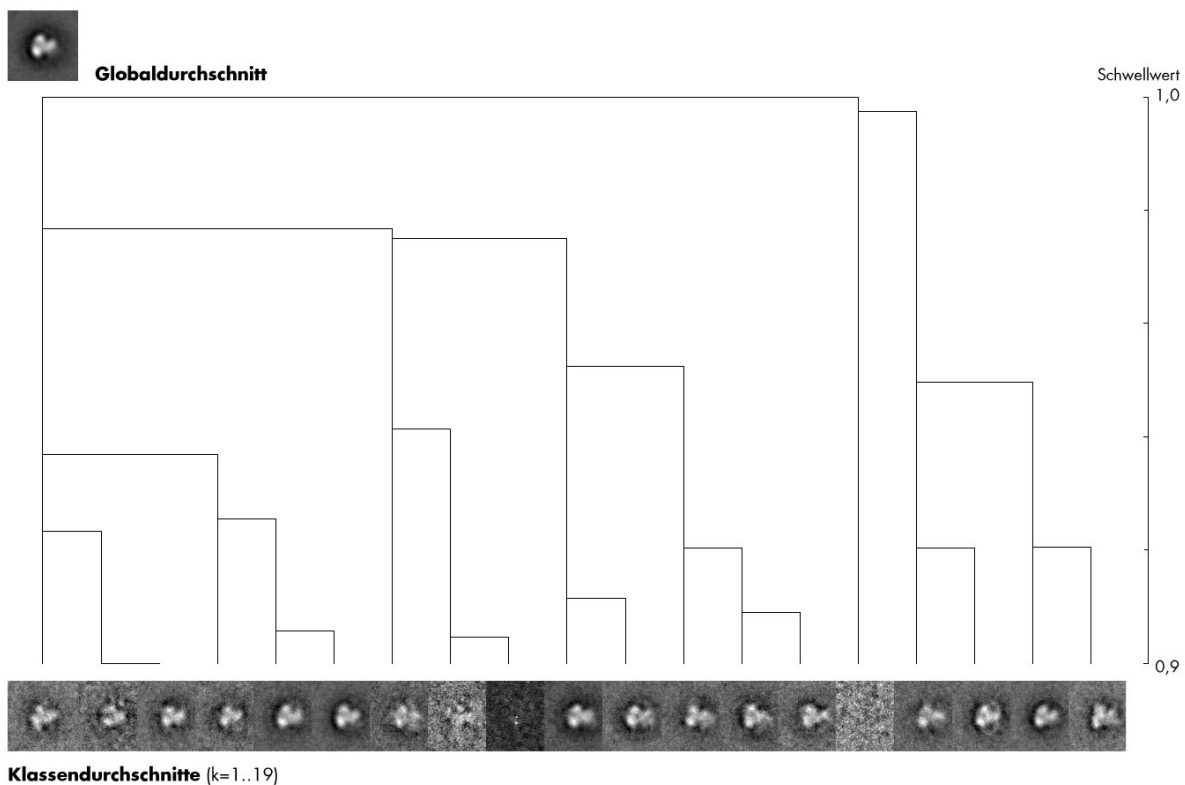


Abbildung 25: Hierarchisch absteigende Klassifizierung der ungekippten Partikel: Zu sehen sind der Globaldurchschnitt aller Partikel und die Klassendurchschnitte der 19 Partikelcluster bei einem Schwellwert von 0,9 mit den zugehörigen Aufspaltungspfaden.

Nach der Bestimmung der Eulerwinkel über die Rotationswinkel aus der Klassifizierung und die Kippwinkel zwischen den Mikrografen für die gekippten und ungekippten Aufnahmen wurde zu jedem dieser Cluster eine Missing Cone Subrekonstruktion aus den gekippten Partikeln berechnet. Es konnten nur drei Artefakt-freie Subrekonstruktionen refined werden (Abbildung 26).

Über die dreidimensionale Rotationsorientierung wurden zwei Rekonstruktionen auf die erste ausgerichtet (Abbildung 26) und mithin die Eulerwinkel der dazugehörigen Partikel angepasst.

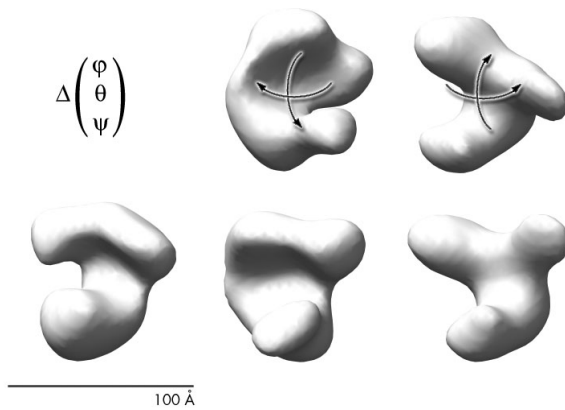


Abbildung 26: Random Conical Tilt Partialrekonstruktionen zueinander orientiert: In der oberen Reihe sieht man die ursprüngliche Orientierung und die notwendigen Rotationsbewegungen, um mit der Referenzrekonstruktion unten links in gleicher Ausrichtung vorzuliegen (untere Reihe mitte und rechts: rotierte Rekonstruktionen aus der oberen Reihe).

Nun konnte eine Zwischenrekonstruktion aus dem Teildatensatz erzeugt werden. Abschließend wurden alle Partikel in die Berechnung eingeschlossen und einem iterativen Refinement unterzogen. Es wurde eine RCT-Struktur bei einer Auflösung von 31,6 Å erhalten. Die RCT-Struktur der OST (Abbildung 27) bei einem maximalen Durchmesser von 124 Å ähnelt einer hohlen Hand mit nur zwei Fingern (I, II), wobei die Fingerspitzen dem Handballen (III) sehr nahe kommen. Durch die y-förmige Verbindung im Handrücken der drei Domänen ergibt sich damit die Grundlage für die charakteristisch dreieckförmigen Partikelabbildungen auf den Mikrografen.

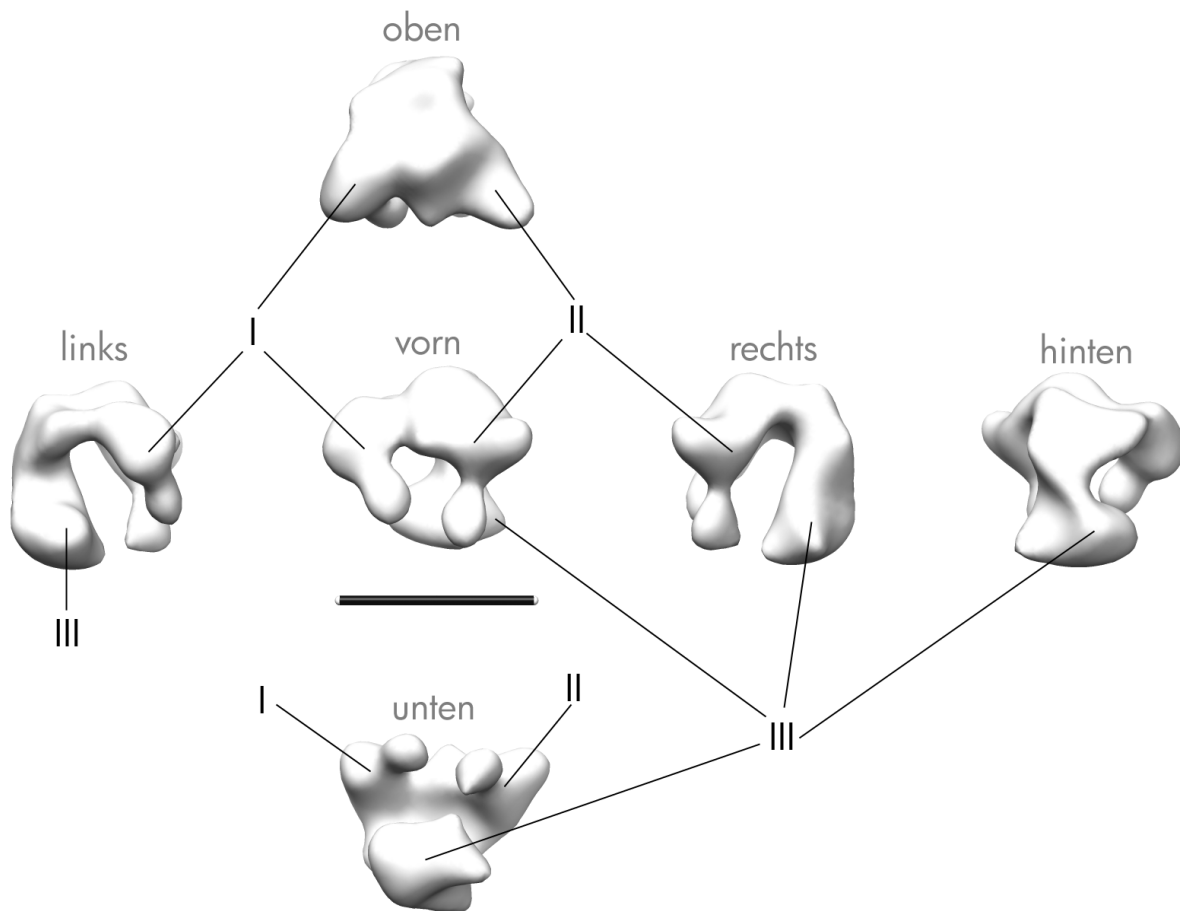


Abbildung 27: RCT-Struktur bei einer Auflösung von 31,6 Å: Dargestellt ist die Rekonstruktion in einer Ansicht von vorn, von links, von rechts, von hinten, von oben, von unten bei einem eingeblendeten Maßstab von 100 Å. Man sieht die fingerförmigen Domänen I, II, die sich mit der handballenförmigen Domäne III y-förmig zu einer hohlen Hand vereinigen.

3.3.3 Common Lines Struktur

Mittels der Random Conical Tilt-Struktur (RCT, vgl. 3.3.2) wurde die Struktur des Common Lines-Ansatzes (CL; vgl. 2.2.2) grundsätzlich verifiziert. Durch den schärferen Kontrast des für den Negative Stain Datensatz der OST genutzten Uranylacetats (vgl. 3.3.1), stachen die strukturellen Features besser hervor. Die Berechnung erfolgte mit 660 Partikeln bei 2,9 Å/Pixel.

Zunächst wurde der Globaldurchschnitt aller Partikel berechnet, der das charakteristisch dreieckförmige Aussehen der Einzelpartikel zeigte. Über die Klassifikation (vgl. 2.2.2) sind 10 Klassendurchschnitte für die initiale Einspeisung in die Common Lines Prozedur erzeugt worden, die in guter Näherung dreieckförmig sind, aber eine Variabilität in der Eckstruktur aufwiesen (Abbildung 28).

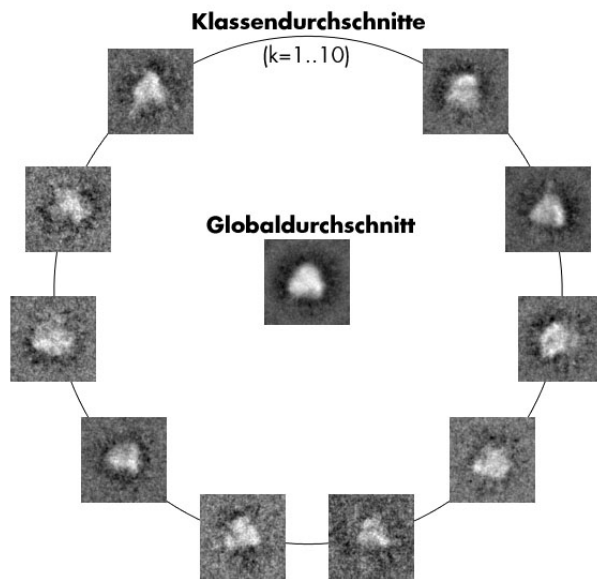


Abbildung 28: 10 Klassendurchschnitte von Partikelgruppen unterschiedlicher Orientierung für die CL Berechnung, in der Mitte der Gesamtdurchschnitt (Globaldurchschnitt).

Vier Klassendurchschnitte hatten eine geeignete Partikelorientierung, d.h. die Projektionsebenen spannten ausreichend große Winkel untereinander auf, so dass sich eine Initialrekonstruktion berechnen ließ. Nach einer Alignierung aller Partikel und einem Refinement erhielt man eine CL-Struktur mit $26,4 \text{ \AA}$ Auflösung. Bei einem ähnlichen Durchmesser von 118 \AA wies die CL-Struktur der OST (Abbildung 29) die grundsätzlich gleichen Merkmale der RCT-Struktur der OST auf (vgl. 3.3.2). Die Finger I, II der mit dem Handballen III im Handrücken y-förmig zu einer hohlen Hand verbundenen Struktur waren hier im Gegensatz zum RCT deutlich voneinander getrennt. Der Handballen III ließ eine hakenförmige Struktur erkennen.

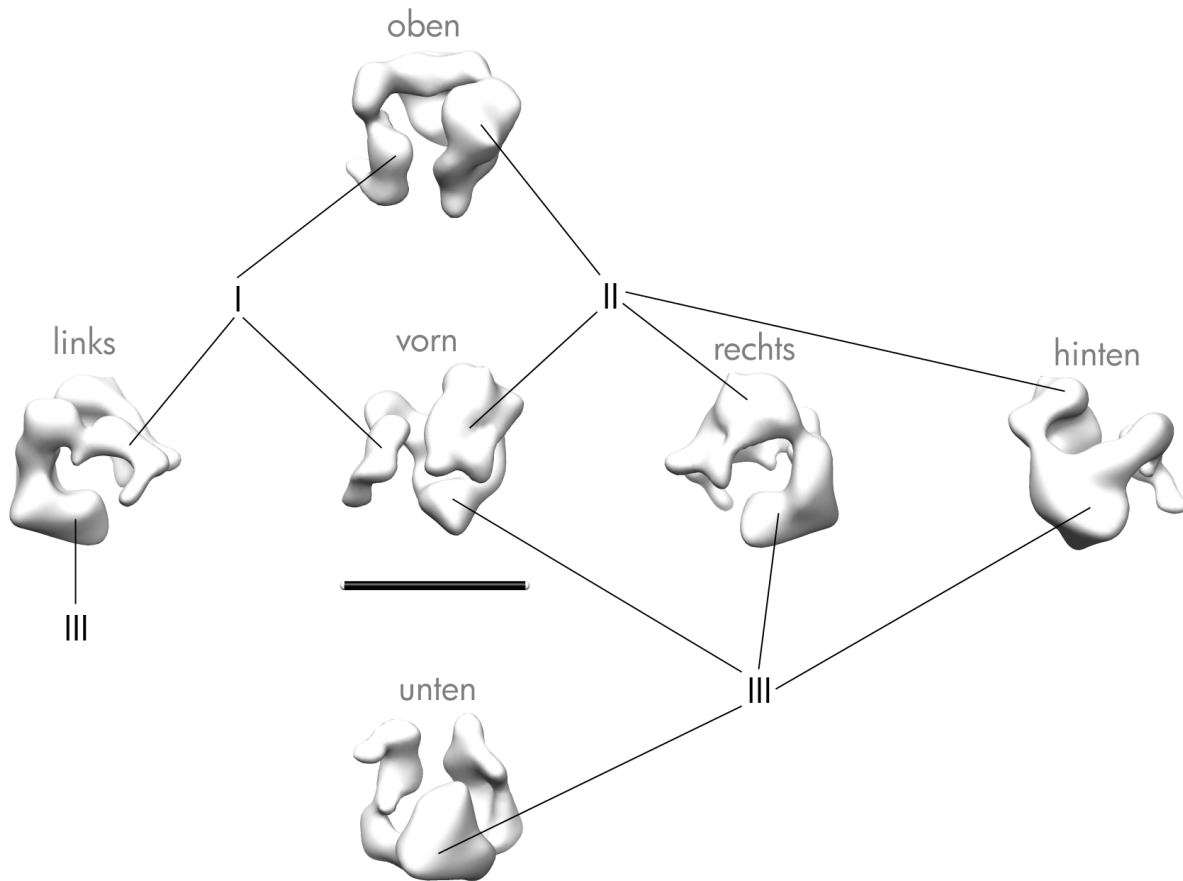


Abbildung 29: CL-Struktur bei einer Auflösung von 26,4 Å: Dargestellt ist die Rekonstruktion in einer Ansicht von vorn, von links, von rechts, von hinten, von oben, von unten bei einem eingeblendeten Maßstab von 100 Å. Man sieht die fingerförmigen Domänen I, II, die sich mit der hakenförmigen Handballen-Domäne III y-förmig zu einer hohlen Hand vereinigen.

Inwieweit Trocknungs- oder Stainingartefakte (z.B. durch den niedrigen pH-Wert der Lösung) die Struktur verzerrten, konnte hier nur im Vergleich mit der RCT-Struktur geschätzt werden. Darum wurden die Datensätze (RCT, CL) vereinigt und daraus eine Gesamtstruktur berechnet.

3.3.4 Gesamtstruktur

Im Vergleich wies die Gesamtstruktur die Definiertheit der CL-Struktur bei der Voluminosität der RCT-Struktur auf (Abbildung 30). Bei einem Durchmesser von 116 Å formte die Negative Stain Gesamtstruktur der Oligosaccharyltransferase (OST) mit einer Auflösung von 27,6 Å eine hohle Hand Struktur mit dem hakenförmigen Handballen III und nur zwei Fingern I und II, die diesem mit den Fingerspitzen nahe kamen. Dabei wurden die Domänen I-III nach aufsteigendem Volumenanteil nummeriert. Sie vereinigten sich y-förmig zu einem verbreiterten Handrücken.

Der Abstand zwischen I und III betrug minimal 25 Å, zwischen II und III 15 Å. Mit maximal 60 Å mal 70 Å und einer Stärke von maximal 20 Å hat der Handrücken einen substantiellen Anteil an der Struktur. Die Finger I, II sind ca. 60 Å lang, der Handballen III nur 40 Å. Der Querschnitt von I betrug an der stärksten Stelle 25 Å bis 35 Å, der von II 35 Å bis 40 Å und der von III 45 Å bis 60 Å.

Vergleicht man das Volumen der Elektronendichte von PglB (Lizak *et al.*, 2011), eines bakteriellen Homologs zur Stt3p-Untereinheit der OST, mit dem Volumen der Gesamtstruktur erreichte diese 70 % des für die OST erwartbaren Volumens. Bezogen auf das SecYE β -Monomer (van den Berg *et al.*, 2004), des proteinleitenden Kanals in *Methanococcus jannaschii*, betrug dieser Wert 83 %. Es blieben also 30 bis 17 % der Struktur obskur.

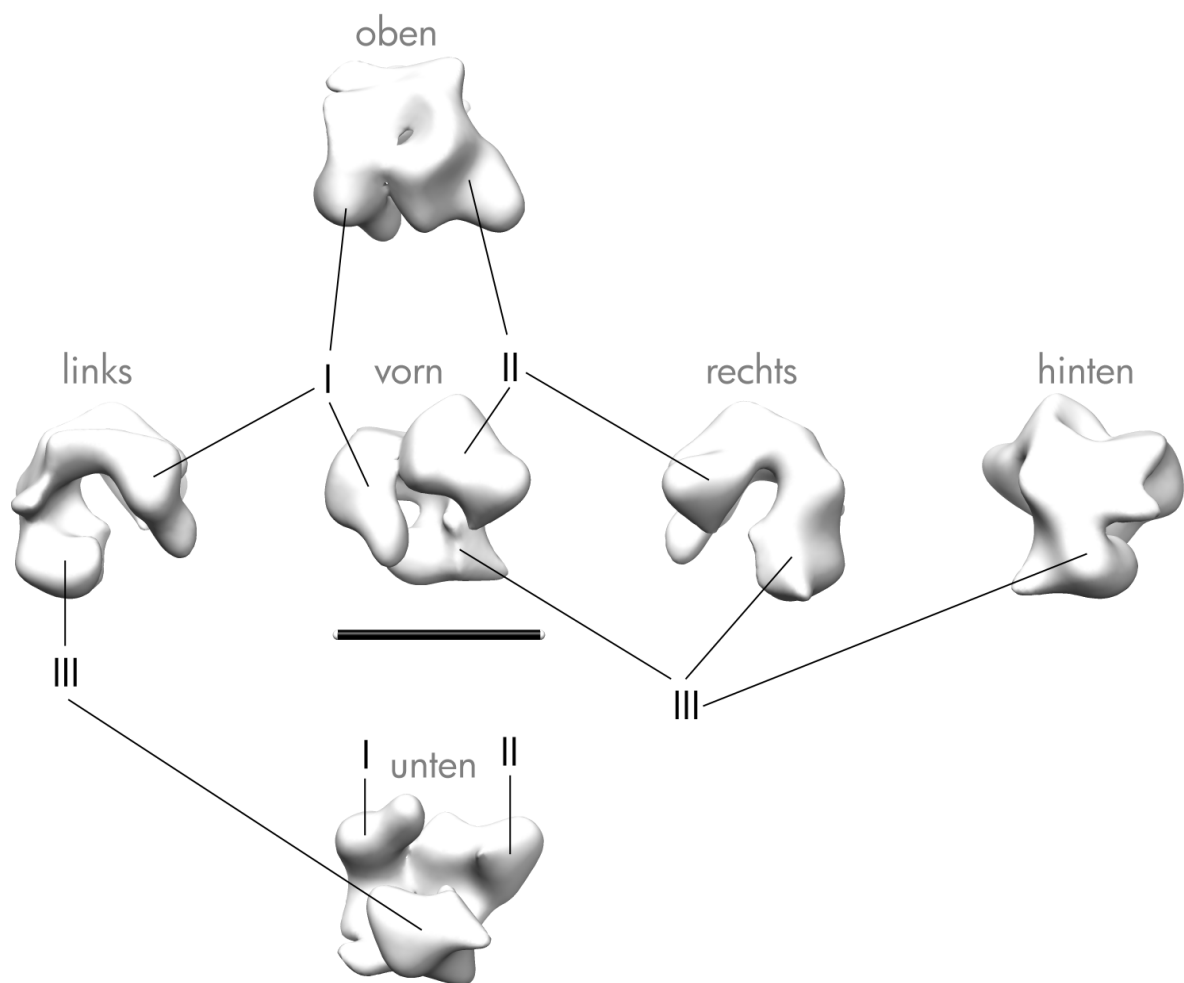


Abbildung 30: Gesamtstruktur bei einer Auflösung von 27,6 Å: Dargestellt ist die Rekonstruktion in einer Ansicht von vorn, von links, von rechts, von hinten, von oben, von unten bei einem eingblendeten Maßstab von 100 Å. Man sieht die fingerförmigen Domänen I, II, die sich mit der hakenförmigen Handballen-Domäne III y-förmig im Handrücken zu einer hohlen Hand vereinigen.

Die Qualität der Auflösungskurve, gekennzeichnet durch das Plateau der Fourier-Shell-Correlation-Kurve (Abbildung 31), war gegenüber dem RCT- bzw. CL-Datensatz sichtbar besser. Die Auflösung der Gesamtstruktur verbesserte sich jedoch nicht gegenüber der CL-Struktur.

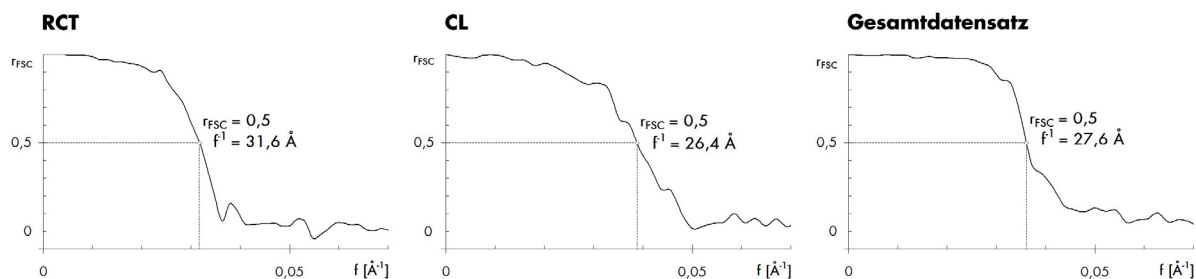


Abbildung 31: Auflösungskurven der Random Conical Tilt (RCT), Common Lines (CL) und Gesamtstruktur (Gesamtdatensatz): Aufgetragen sind die Fourier-Shell-Correlation-Werte (r_{FSC}) über der Raumfrequenz (f in \AA^{-1}). Für den Wert von $r_{FSC} = 0,5$ ließen sich die Auflösungen berechnen.

3.3.5 Molecular Docking

In die Gesamtstruktur konnte die Elektronendichte von PglB (Lizak *et al.*, 2011), dem bakteriellen Homolog zur Stt3p-Untereinheit der OST, als starrer Körper (rigid Body) im Handrücken gedockt werden. Nach dem Zerteilen der Rekonstruktion in die Domänen III (Handrücken und Handballen) sowie I und II (Finger) ließ sich ein Hybridmodell zur weiteren Verwendung und Analyse kreieren.

Die auf eine Auflösung von 30 \AA berechnete Elektronendichte von PglB konnte mit einer Korrelation von 0,95 in den Handrücken und den Handballen III der Gesamtstruktur als rigid Body gedockt werden (Chimera, Fit in Map, vgl. 2.2.5). Es war nach dem Einfügen der Kristallstruktur von PglB (Abbildung 32) sofort ersichtlich, dass die Hakenform des Handballens auf die luminale Domäne von PglB zurückzuführen war (III-LD im Hybridmodell). Der Handrücken wurde zu über 90 % von der membranalen Domäne (III-MD) ausgefüllt. Das Rückgrat der Gesamtstruktur scheint also keine Stain-Artefakte aufzuweisen.

Somit ließen sich der Finger I mit 18 % und der Finger II mit 28 % des Gesamtvolumens von der Domäne III separieren (Abbildung 32), so dass PglB ca. 50 % der Struktur ausfüllt.

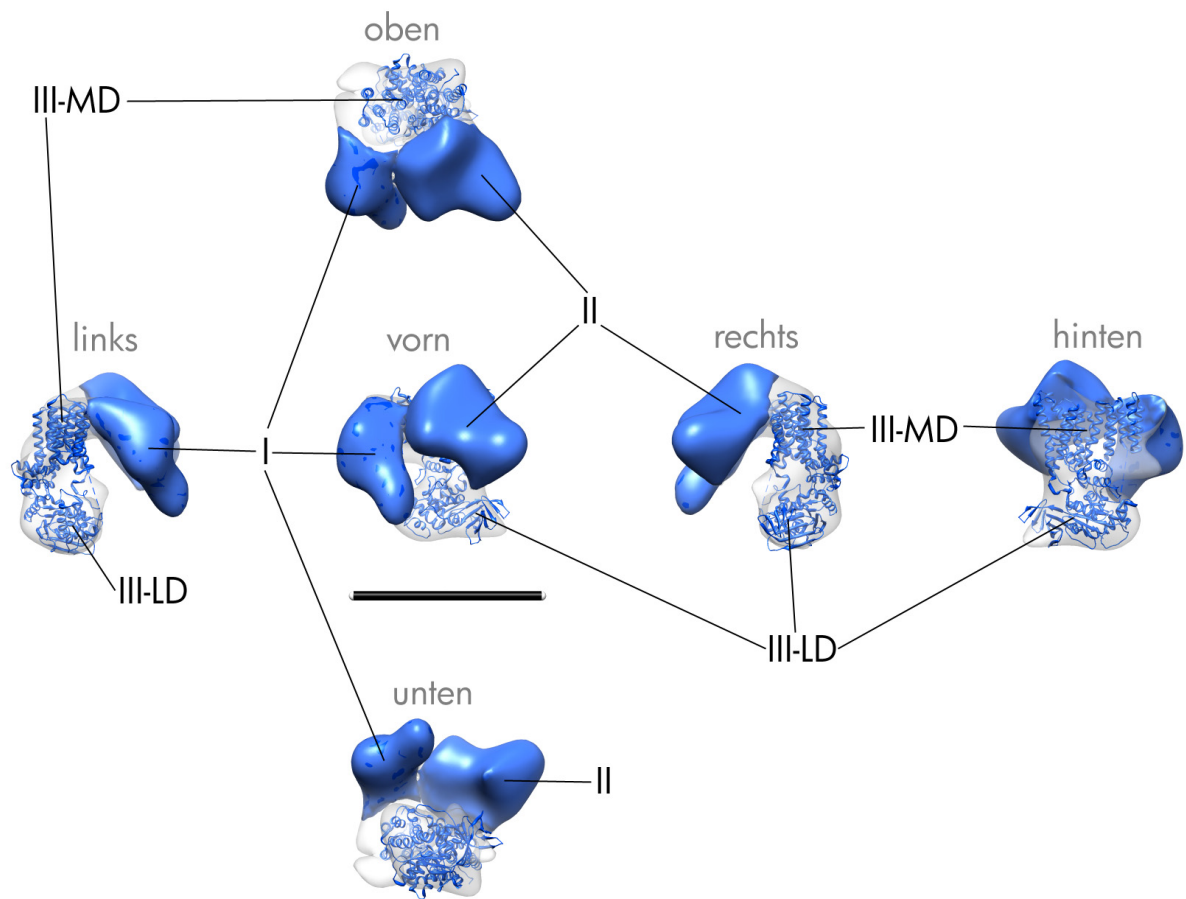


Abbildung 32: Hybridmodell in der Ansicht von vorn, links, rechts, hinten, oben, unten bei einem Maßstab von 100 Å: Zu sehen sind die membranale Domäne III (III-MD) der PglB (blaue Ribbonsdarstellung) im Handrücken, die hakenförmige luminal Domäne III (III-LD) der PglB im Handballen, die Finger I und II.

Das fehlende Volumen von 17 bis 30 % der Gesamtstruktur (vgl. 3.3.4) sollte also den Fingern I, II zugeschrieben werden.

3.4 Struktur des OST-Sec61-Translokons

In vitro ließ sich der OST-Sec61-80S-Komplex, d.h. der trimere Komplex aus Oligosaccharyltransferase, Sec61-Komplex und Ribosom, unter den von uns gewählten Bedingungen rekonstituieren (vgl. 3.2.4). Da die Bindung der OST an den Sec61-80S-Komplex spezifisch, d.h. sättigbar (vgl. 3.2.4), war, wurde die Kryo-EM-Struktur eines definierten OST-Sec61-Translokons erwartet.

3.4.1 Struktur des OST-Sec61-RNC-Komplexes

Um eine optimale Sättigung mit Liganden auf dem Grid zu gewährleisten, wurden RNCs (vgl. 3.2.3; zur besseren Vergleichbarkeit freundlicherweise von Dr. Thomas Becker zur Verfügung gestellt) zur Rekonstitution mit dem 8-fachen Überschuss an Sec61-Komplex und dem 6,6-fachen Überschuss an OST für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aus den Kryo-EM-Aufnahmen (vgl. 2.1.19) konnten 39114 Partikel für die 3D-Kryo-EM Einzelpartikelrekonstruktion des OST-Sec61-RNC-Komplexes selektiert werden (vgl. 2.2.1). Das initiale Alignment (vgl. 2.2.1) bei 3,26 Å/Pixel erfolgte mit der Struktur eines programmierten Ribosoms, d.h. eines Ribosoms mit einer Peptidyl-t-RNA, welche nach der Entfernung der Dichte des proteinleitenden Kanals durch Maskierung (vgl. 2.2.5) erhalten wurde. Die erste 3D-Rekonstruktion (Abbildung 33, 1) zeigte zunächst ein Ribosom mit einer Translokondichte bei einer Auflösung von 21,4 Å. Nach 10 Runden Refinements konnte die Translokondichte erhöht werden, wobei sich die Auflösung auf 19,4 Å verbesserte. Nun wurde der Datensatz bzgl. programmierter Ribosomen mit und ohne Translokondichte für 3 Runden sortiert (Abbildung 33, 14). Von den ursprünglich erfassten 39114 Partikeln zeigten danach 11270 Partikel keine Translokondichte, während 27844 Partikel für eine weitere Sortierung im Datensatz verblieben. Nach weiteren 13 Runden einer Sortierung in programmierte Ribosomen mit Translokondichte gegen leere Ribosomen ohne Translokondichte wurden weitere 4276 Partikel entfernt (Abbildung 33, 27). Die nun erhaltene 3D-Struktur von inzwischen 17,2 Å Auflösung (BP RP, vgl. 2.2) wies eine signifikante Translokondichte mit einer Ausdehnung von ca. 70 Å in Membranrichtung anstatt der für den Sec61 üblichen Stärke von ca. 40 Å auf.

Versuche, den Datensatz auf eine RNC-Sec61-Struktur (Becker, 2007) zu alignieren, zeigten keinen Erfolg. Nach dem iterativen Refinement wurde wieder die Ausgangsstruktur erreicht. Das OST-Sec61-Translokons dieser Struktur unterschied sich also signifikant von dem Sec61-Translokons. Eine Sortierung gegen eine Referenz mit dem Expansionssegment ES27 in Exit-Position brachte keine Verbesserung und wurde verworfen.

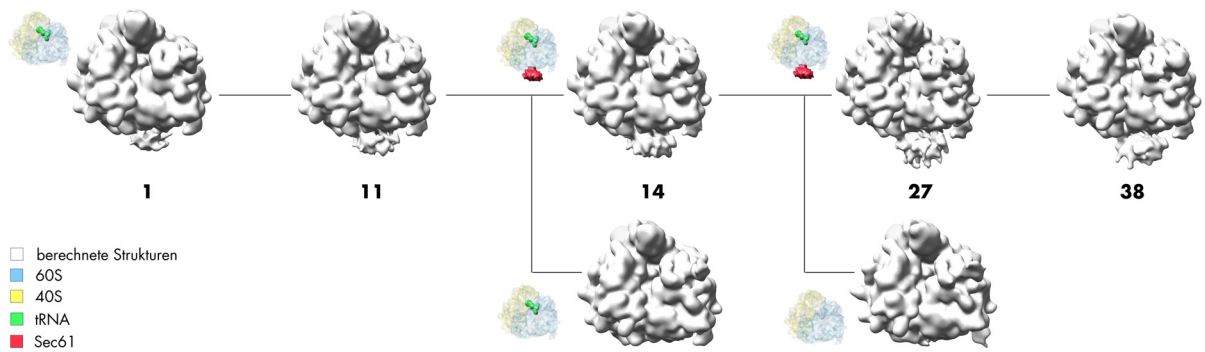


Abbildung 33: Refinement und Sortierung des OST-Sec61-RNC-Datensatzes (vgl. 2.2.1): In Weiss dargestellt sind die berechneten 3D-Strukturen mit der Angabe der Berechnungsrunde (1, 11, 14, 27, 38). Klein und farbig sind die Referenzrekonstruktionen abgebildet: Hellblau für die 60S-Untereinheit, Gelb für die 40S-Untereinheit, Grün für die t-RNA, Rot für den Sec61-Komplex. Der obere lineare Pfad zeigt zwei Verzweigungen, an denen jeweils eine Sortierung erfolgte. Die Rekonstruktionen der herausgenommenen Partikel sind unten an den Verzweigungsendpunkten positioniert.

Abschließend erfolgte das Refinement (vgl. 2.2.1) der verbliebenen 23568 Partikel bei 2,45 Å/Pixel für weitere 11 Runden (Abbildung 33, 38). Für den OST-Sec61-RNC-Komplex wurde eine Auflösung von 15,4 Å mittels BP RP (vgl. 2.2) erreicht (Abbildung 34).

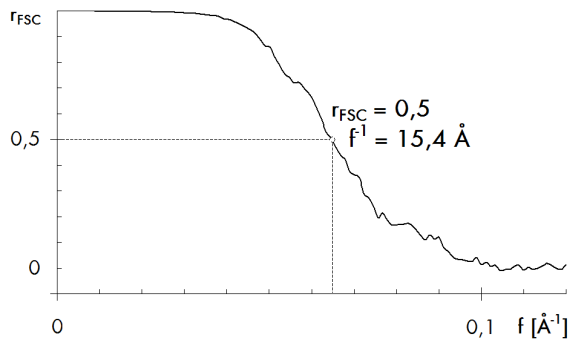


Abbildung 34: Auflösungskurve der 3D-Struktur des OST-Sec61-RNC-Komplexes: Aufgetragen sind die Fourier-Shell-Correlation-Werte (r_{FSC}) über der Raumfrequenz (f in Å⁻¹). Für den Wert von $r_{FSC} = 0,5$ ließ sich die Auflösungen von 15,4 Å berechnen.

Die erhaltene Rekonstruktion ließ sich durch Maskierung (vgl. 2.2.5) in die Bestandteile auftrennen: die 60S-Ribosomenuntereinheit, die 40S-Untereinheit, die Peptidyl-t-RNA und das OST-Sec61-Translokon. Dabei konnten die prominenten Features des Ribosoms gut dargestellt werden (siehe Abbildung 35), insbesondere auch die gut ausgebildete Dichte des Expansionssegments ES27 in der L1-Position.

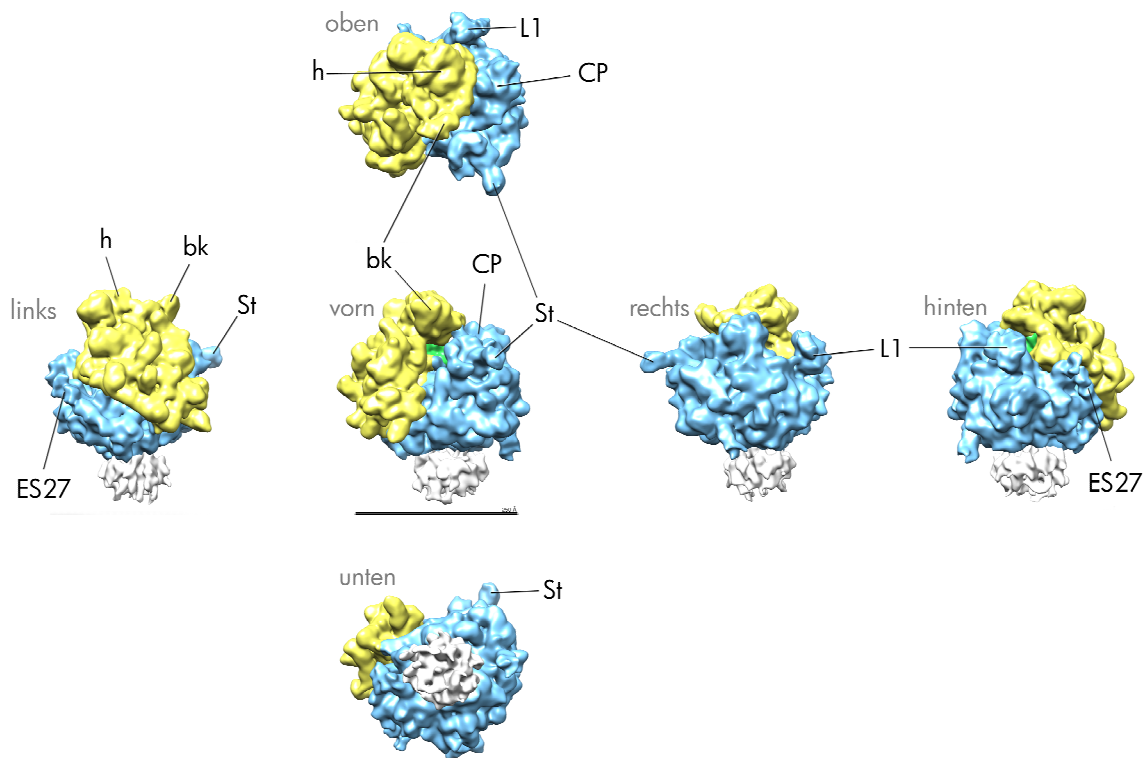


Abbildung 35: Darstellung der farbkodierten 3D-Struktur des OST-Sec61-RNC-Komplexes: Gezeigt sind die Ansicht von vorn, von links, von rechts, von hinten, von oben, von unten mit einem Maßstab von 250 Å - Hellblau die 60S-Untereinheit, Gelb die 40S-Untereinheit, Grün die Peptidyl-t-RNA, Weiss das OST-Sec61-Translokion. Markante Details des Ribosoms sind: Head (h), Central Protuberance (CP), Stalk (St), Beak (bk), L1 Protuberance (L1), Expansionssegment 27 (ES27) – vgl. Beckmann *et al.* (CSH), 2001.

Die Dichte des OST-Sec61-Translokons wirkt ähnlich konturiert wie das Ribosom.

3.4.2 Das am Ribosom gebundene OST-Sec61-Translokion

Von der zytosolischen ribosomalen Kontaktfläche betrachtet (Ansicht von oben), weist das OST-Sec61-Translokion (Abbildung 36) eine im Kern rechteckige (88 Å * 92 Å) Form bei einer kreisrunden Gesamterscheinung mit 120 Å Durchmesser auf. In membranaler Ausrichtung erreicht das Translokion eine Ausdehnung von bis zu 70 Å.

Wie gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 36), hat das OST-Sec61-Translokion 6 Verbindungen (C1 bis C6) mit dem Ribosom und weist eine Pseudoverbindung (PC) auf - d.h. hier kamen sich das Ribosom und das Translokion strukturell nahe, ohne dass die 3D-Struktur eine verbindende Elektronendichte zeigte. Nur die 60S-Untereinheit ist an der Bindung beteiligt. Die Verbindungen 2 bis 6 und die äußere Basis der Pseudoverbindung liegen beim Blick auf die zytosolische

Membranfläche des Translokons auf einem Kreis von 55 Å Durchmesser (Ansicht von oben). Das Translokon und das Ribosom liegen in diesem Bereich mit Zugängen von 8 Å bis 12 Å sehr dicht aneinander. Das Tunnelende (TE) des ribosomalen proteinleitenden Kanals endet an der Verbindung 3.

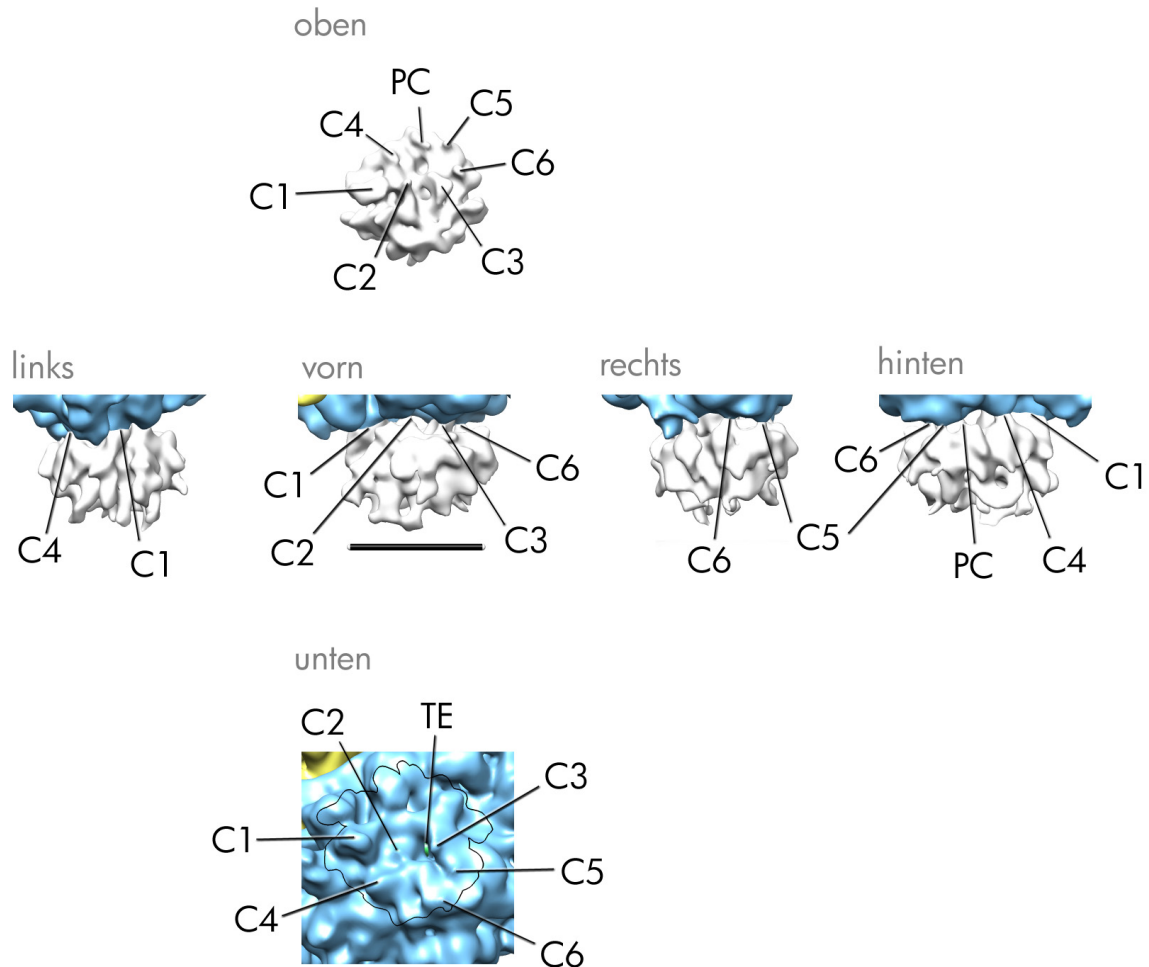


Abbildung 36: Ausschnitt der 3D-Struktur des OST-Sec61-RNC-Komplexes mit Fokus auf dem Translokon: Dargestellt sind in der Ansicht von vorn, von links, von rechts, von hinten (also quer zur Membran), von oben (also der Ansicht auf die zytosolische Membranfläche des Translokons) und von unten (also der Ansicht auf die Kontaktfläche des Ribosoms mit dem Translokon) mit einem Maßstab von 100 Å die Verbindungen 1 bis 6 (Connection C1 bis C6), die Pseudoverbindung (PC) und das Tunnelende (TE) (Hellblau die 60S-Untereinheit, Gelb die 40S-Untereinheit, Grün die t-RNA, Weiss das Translokon, Schwarz dessen Umriss).

Mit Hilfe des *Archaea*-Modells und des Hefemodells für die große Untereinheit (PDB: IFKF; Spahn *et al.*, 2001; Beckmann *et al.*, 2001) konnten die möglichen ribosomalen Bindungsanteile der rRNA und den Proteinen zugeordnet werden (Abbildung 37; Tabelle 2). An der Bindung

beteiligt sind die Helices 7, 24, 50, 53 und 59 der 25S-rRNA sowie die ribosomalen Proteine rpL19, rpL25, rpL26 und rpL35.

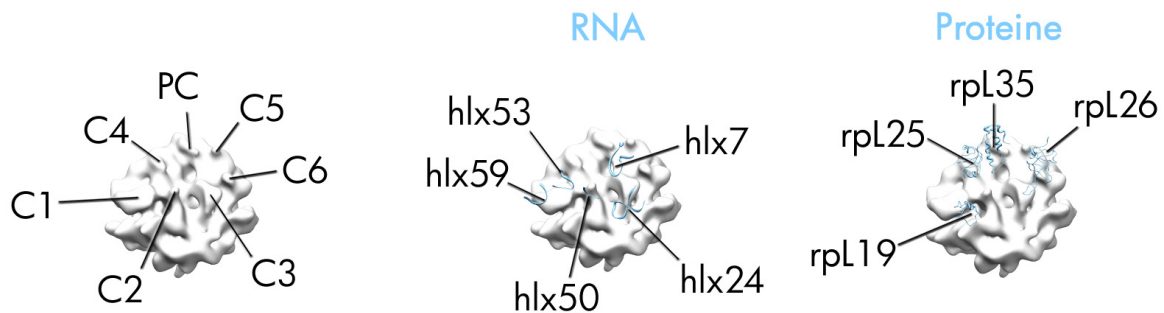


Abbildung 37: Lage der bindenden rRNA-Helices (RNA) und ribosomalen Proteine (Proteine) auf der zytosolischen Kontaktfläche des OST-Sec61-Translokons: Verbindungen 1 bis 6 (C1 bis C6), Pseudoverbindung (PC), Helices 7, 24, 50, 53, 59 (hlx), Proteine rpL19, rpL25, rpL26, rpL35.

Tabelle 2: Aufschlüsselung der an der Translokon-Bindung beteiligten ribosomalen RNA (aus dem *Archaea*-Modell) und der ribosomalen Proteine (aus dem Hefemodell) – vgl. Spahn *et al.*, 2001; Beckmann *et al.*, 2001

Verbindung	Protein	Position	rRNA	Position
C1	rpL19	Ser36-Lys45	Helix59	G1627-C1633
	rpL25	Met72-Gly78	Helix53	G1498-U1500
C2	rpL19	Glu33-Arg37	Helix53	U1500-A1502
	rpL25	Thr67-Met72	Helix50	U1422-A1424
C3	rpL26	Lys84-Pro96	Helix24	A485-C490
			Helix7	G81-G92
C4	rpL25	Asp128-Ala135	Helix7	G91-C93
	rpL35	Val22-Ser37		
C5	rpL26	Asp112-Arg115	Helix7	A95-G97
C6	rpL26	Asp54-Leu57	Helix7	G79-G81
		Gln66-Lys69		

3.4.3 Das isolierte Ribosomen-gebundene OST-Sec61-Translokon

Die OST-Sec61-Translokon-Struktur, welche aus der OST-Sec61-RNC-Struktur durch Maskierung freigestellt wurde (vgl. 3.4.1), weist signifikante Besonderheiten auf (siehe 3.4.2). Insbesondere die kreisrunde Anordnung der meisten Verbindungsstellen zum Ribosom (vgl. 3.4.2; siehe Abbildung 38) als auch die klar abfallende Stärke der Verbindungen ($C1 \gg C3 \gg C4 > C6 > C2 = C5$) sind bemerkenswert.

Vergleicht man das erhaltene Translokon mit der Auflösung von 15 Å mit dem auf 30 Å filtrierte Translokon entdeckt man dezentral eine porenförmige Vertiefung (P) und kann die Rangfolge der Verbindungen in ihrer Stärke ($C1 > C3 > C4$) sehr deutlich erkennen (Abbildung 38). Damit umschließen die kreisrund angeordneten Verbindungen also diese porenförmige Vertiefung. Die zytosolische Membranfläche des Translokons lässt sich nun besser als eine pentagonale Fläche (Abbildung 38, bei 30 Å) mit folgenden Seitenlängen beschreiben: 76 Å, 74 Å, 58 Å, 52 Å, 62 Å - wobei an zwei Seiten Ausstülpungen herausragen. Bei einer Fläche von 6900 Å² sollten nach der Abschätzung von Beckmann *et al.* (Beckmann *et al.*, 2001) 36 bis 38 transmembrane Helices Platz finden. Die OST mit 27 und der Sec61-Komplex mit 12 kämen auf 39 transmembrane Helices.

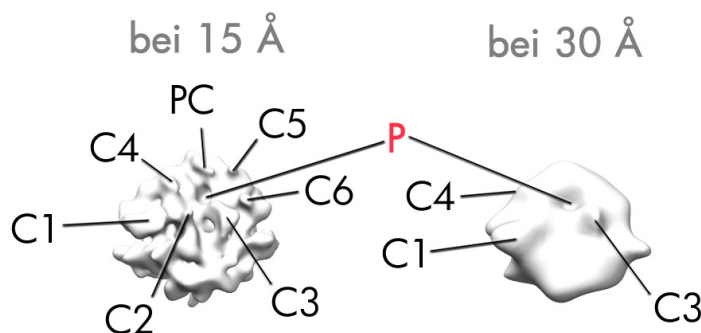


Abbildung 38: Vergleich der zytosolischen Kontaktfläche des isolierten Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons bei einer Auflösung von 15 Å und bei 30 Å: Verbindungen 1 bis 6 (C1 bis C6), Pseudoverbindung (PC), porenförmige Vertiefung (P).

Nun lag es nahe, in der porenförmigen Vertiefung des Translokons die Pore eines Sec61-Komplexes zu vermuten, zumal sich diese in der unmittelbaren Nähe des bei Verbindung 3 (C3) mündenden Ausgangs des ribosomalen proteinleitenden Tunnels befindet (vgl. Abbildung 36). Jedoch zeigen Strukturen monomerer an das Ribosom gebundener proteinleitender Kanäle eine andere Lage der Pore (vgl. 1.1.1). Daher wurde nun die Position eines am Hefe-Ribosom gebundenen SSH-Komplexes (Becker *et al.*, 2009) zum Vergleich herangezogen (Abbildung 39). Da die erreichte Auflösung von 15 Å zu niedrig für flexibles Docking war, wurde nun die mit SPIDER auf 15 Å filtrierte Elektronendichte (FQ, Buter Low Pass, vgl. 2.2) eines SecYEβ-Monomers (van den Berg *et al.*, 2004), des *archaealen* Homologs zum Sec61-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae*, als starrer Körper (rigid body) in das OST-Sec61-Translokon gedockt. Dabei dienten in der SecYEβ-Struktur die Pore (P), die Loops 6/7 verbunden mit 8/9 (L6/7 + L8/9), der C-Terminus von Helix 10 (10C) und das Scharnier 5/6 (H5/6, nicht gezeigt) als Ankerpunkte. In der Translokonstruktur waren dies die porenförmige Vertiefung (P), die Verbindung 3 (C3), die Verbindung 2 (C2) und der zentrale Dorn (CT, siehe später Abbildung 42), der von der luminalen Seite des Translokons erkennbar ist.

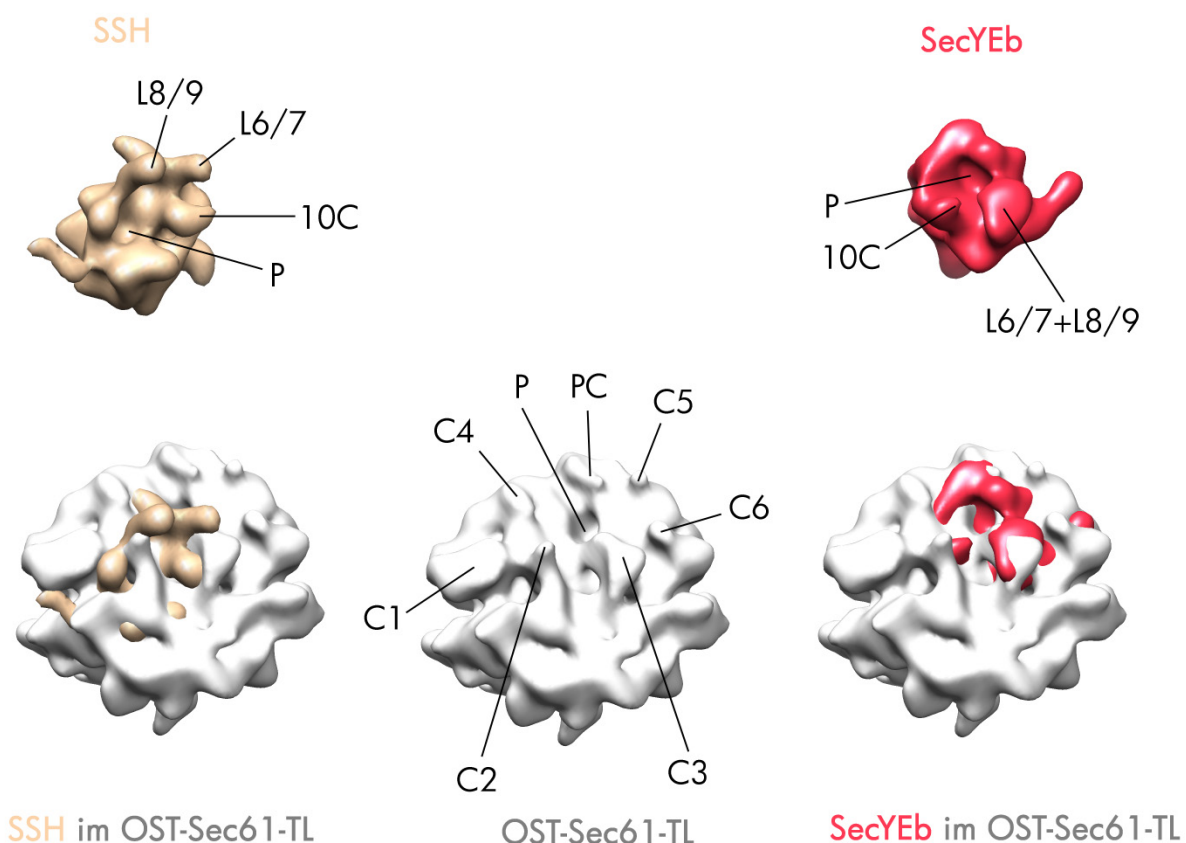


Abbildung 39: Vergleich der Position des SSH-Kanals mit dem gedockten SecYEβ-Monomer (SecYeb) im OST-Sec61-Translokon (OST-Sec61-TL) bei 15 Å: Kanal-Loops 6/7 und 8/9 (L6/7, L8/9), C-Terminus (10C), Pore bzw. porenförmige Vertiefung (P), ribosomale Verbindungen (C1 bis C6), Pseudoverbindung (PC).

Der gedockte SecYE β -Komplex war gegenüber dem SSH-Komplex um ca. 180 ° gedreht mit der Drehachse zwischen den Loops 6/7 und dem C-Terminus des Kanals. Gleichzeitig waren die Verbindungen des SSH zum Ribosom um 10 Å zu den Verbindungen des OST-Sec61-Translokons (C2, C3) versetzt und überdeckten die porenförmige Vertiefung (P), wobei die SSH-Pore nicht in der Translokonstruktur erkennbar wäre.

Die Restdichte des OST-Sec61-Translokons sollte nun die OST enthalten. Im Falle des SSH würde sie den Kanal kreisförmig umschließen, im Falle des SecYE β würde sie bogenförmig an den Kanal rückwärtig anschließen. Die kreisförmige Restdichte um den SSH könnte eine Mizelle sein, wäre dafür aber zu groß (vgl. 1.1.1). Insbesondere, da die Strukturanalyse (Abbildung 39) ergab, dass der SSH zu den OST-Sec61-Translokons-Verbindungen versetzt ist und die porenförmige Vertiefung überdeckt, könnte der gedockte SecYE β eine alternative Bindungsposition am Ribosom darstellen. Diese wurde nun als Grundlage für die weitere Auswertung gewählt. Ohne markante Anhaltspunkte des Translokons ließ sich die ebenso mit SPIDER auf 15 Å filtrierte Elektronendichte (FQ, Buter Low Pass, vgl. 2.2) der membranalen Domäne von PglB, dem bakteriellen Homolog der Stt3p-Untereinheit der Oligosaccharyltransferase, überraschend deutlich mit einer Korrelation von 0,75 docken (Chimera, Fit in Map, vgl. 2.2.5). Dazu wurde sie zunächst mittig aber randständig im membranalen Restteil (R) des Translokons eingefügt und durch Chimera abschließend positioniert (Abbildung 40, Mitte – wobei hier bereits die gesamte PglB-Struktur dargestellt ist).

Überraschend ist dabei die Tatsache, dass PglB exakt an das SecYE β -Monomer anschließt (Abbildung 40, unten). Immerhin hätte es durch die Positionierung in der gesamten Translokondichte auch eine Überschneidung mit der bereit gedockten Kanaldichte geben können.

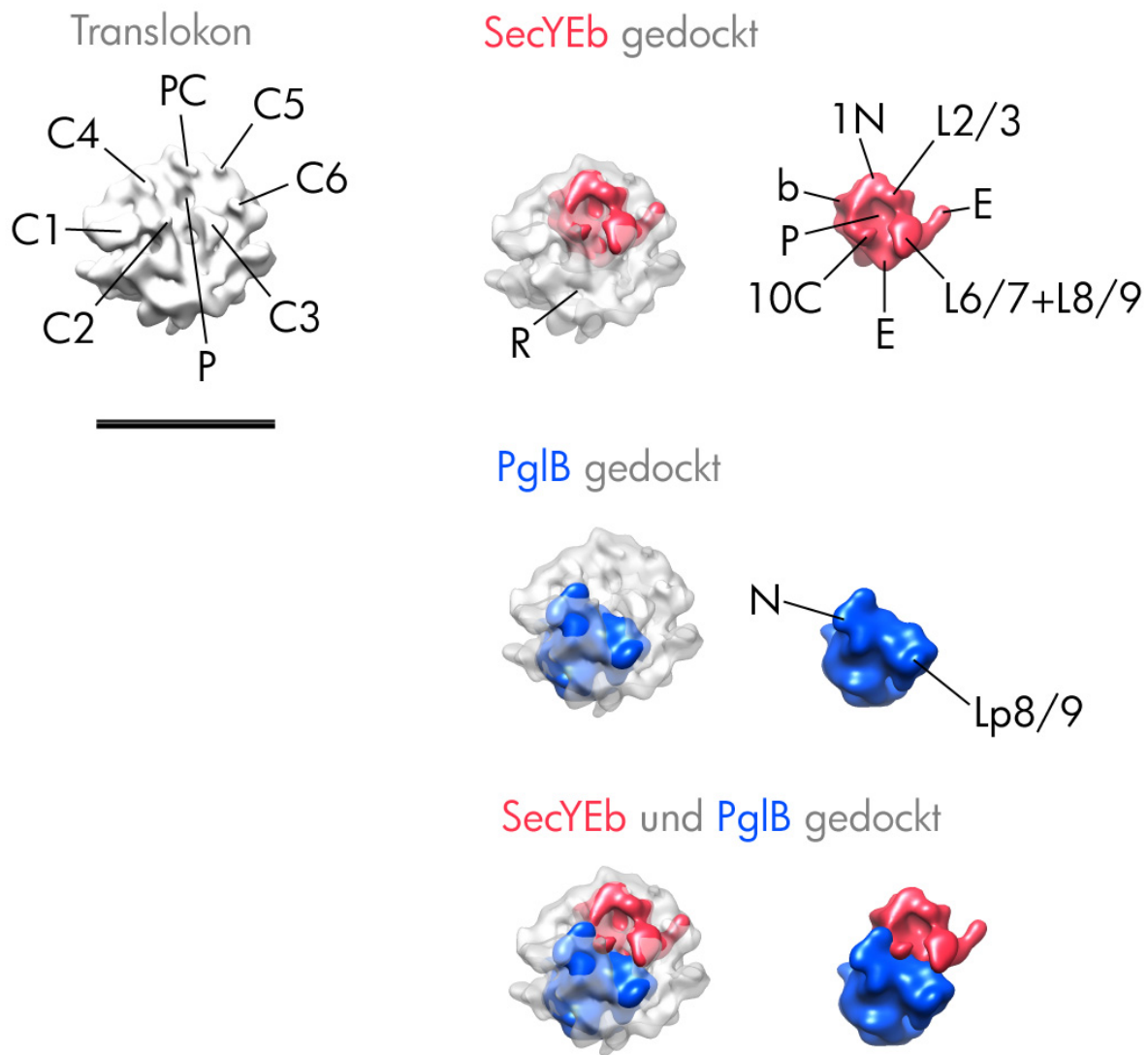


Abbildung 40: Rigid Body Docking des SecYEB-Monomers (SecYEB) und von PglB in das OST-Sec61-Translokon: Verbindungen des Translokons zum Ribosom 1 bis 6 (C1 bis C6), Pseudoverbindung (PC), Pore bzw. porenförmige Vertiefung (P), Restdichte nach Docking des SecYEB (R), N-Terminus von SecY (1N), C-Terminus von SecY (10C), Loops von SecY (L2/3, L6/7, L8/9), SecE (E), Secβ (b), N-Terminus von PglB (N), Loop 8/9 von PglB (Lp8/9), Maßstab 100 Å.

PglB dient hiermit als Modell für Stt3p, der katalytischen Untereinheit der Oligosaccharyltransferase aus *Saccharomyces cerevisiae*, SecYEB als Modell für den Sec61-Komplex. Anhand der eingefügten Kristallstrukturen von SecYEB und PglB an Stelle der in das OST-Sec61-Translokon gedockten Elektronendichten (Abbildung 41) wurde eine erste noch zu verifizierende Bindungshypothese mittels dieses Hybridstrukturmodells erstellt (Tabelle 3). Zunächst ließ sich aber feststellen, dass sich die membranalen Helices von PglB und SecYEB im oberen Teil der Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokondichte befinden, d.h. dem ca. 40 Å starken Membranteil. Die luminal Domäne von PglB kann der weiteren Translokondichte

Der aktive proteinleitende Kanal sollte natürlich ein geöffneter Sec61-Komplex sein, bei dem die Transmembranhelices in einer dafür geeigneten Ausrichtung vorliegen würden (vgl. z.B. Frauenfeld *et al.*, 2011). Es wurde unter dieser Prämisse eine Hypothese aufgestellt, welche vermutlichen Anteile den beobachteten Translokonfeatures zuzuschreiben sein könnten (Tabelle 3). D.h. es wurden N-Terminus, C-Terminus und Loops von SecY sowie die β -Untereinheit als auch der N-Terminus von SecE bei räumlicher Nähe zu den Verbindungen C1 bis C6 und der Pseudoverbindung (PC) miteinander assoziiert.

Tabelle 3: Bindungshypothese: Zuordnung vermutlich ribosomal bindender Bereiche des Sec61-Komplexes (im SecYE β -Modell) und von Stt3p (im PglB-Modell): Translokon-Ribosom-Verbindungen 1 bis 6 (C1 bis C6), Pseudoverbindung (PC), N-Terminus von Stt3p (N), Loop 12/13 von Stt3p (Lp12/13), C-Terminus von Sec61p (10C), Loops 2/3, 6/7, 8/9 von Sec61p (L2/3, L6/7, L8/9), β -Einheit vom Sec61-Komplex (b), Knick in Helix 8 von Sec61p (K8), N-Terminus von der γ -Einheit vom Sec61-Komplex (N.E), N-Terminus von Sec61p (1N)

Verbindung	Komplex	Region	Position
C1	OST	N	Glu2-Asp9
	OST	Lp12/13	Ile404-Leu406
C2	Sec61	10C	Leu426-Leu433
C3	Sec61	L6/7	Pro234-Lys246
	Sec61	L8/9	Leu352-Ser362
C4	Sec61	b	Glu21-Val28
	Sec61	1N	Glu15-Ile21
C5	Sec61	L2/3	Gly90-Ser99
C6	Sec61	K8	Phe333-Asp341
	Sec61	N.E	Thr2-Leu23
PC	Sec61	1N	Lys2-Pro12

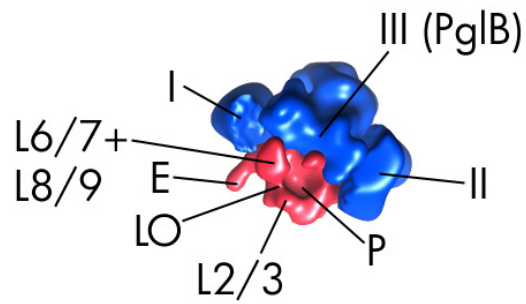
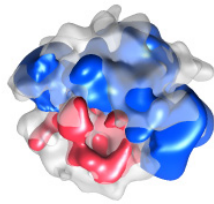
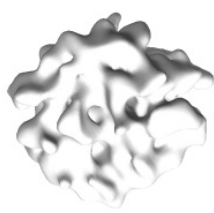
Die porenförmige Vertiefung könnte dabei durch die schlaufenförmig insertierte naszierende Proteinkette des RNC gebildet werden, wobei die Signalankersequenz zwischen den Helices 2 und 7 die äußere Begrenzung der porenförmigen Vertiefung aufrecht erhielt

(Vergleichsmodellberechnung nicht gezeigt). Eine zusätzliche Dichte zwischen den Verbindungen C5 und C6 könnte spekulativ dem His-HA-Tag zuzuschreiben sein. Denkbar ist auch, dass das OST-Sec61-Translokon in einer schwach ausgeprägten Mizelle (analog Becker *et al.*, 2009) vorliegt. Das kann bei der erreichten Auflösung nicht bestimmt werden.

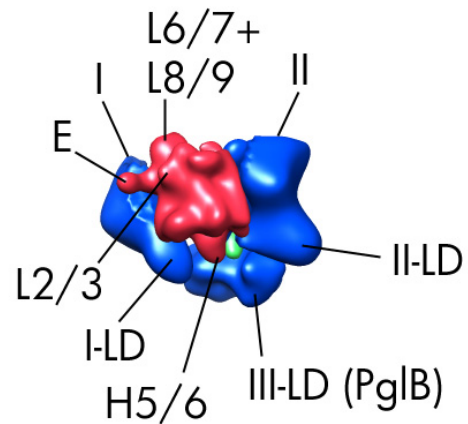
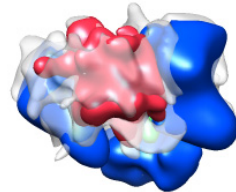
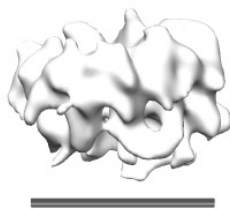
3.4.4 Hybridmodell des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons

Nach dem Docken des Stt3p-Modells (PglB) waren noch die zwei Finger I, II des OST-Hybridmodells (vgl. 3.3.5) zur Vervollständigung in das Ribosomen-gebundene OST-Sec61-Translokon einzufügen. Der Finger I der OST ließ sich mit einer guten Korrelation von 0,70 in die auf 30 Å filtrierte Translokondichte anhand der 15 Å-Struktur docken (I, Abbildung 42). Für den Finger II der OST (II, Abbildung 42) ergab sich ein unbefriedigender Wert von 0,32. Stt3p (PglB) als auch der Sec61-Komplex (SecYEß) verblieben wie zuvor beschrieben (vgl. 3.4.3). Ein weiteres erwähnenswertes Feature ist die Lage der Scharnierregion von Sec61p (H5/6) von der luminalen Seite des Translokons betrachtet im Zentrum des sich dort befindenden Zentralen Dorns (CT, Abbildung 42). Die luminaire Domäne des OST-Fingers I käme dabei seitlich zur lateralen Öffnung (LO) des Kanals in Kontaktmöglichkeit mit der translozierenden Proteinkette. Der membranalen Domäne des OST-Fingers II sollten weitere Kontakte im Bereich der Verbindung 1 (C1) zum Ribosom zuzuordnen sein, wobei die luminaire Domäne nah an die hakenförmige luminaire Domäne von Stt3p (PglB) anschließt. Von der Domäne III, die von der gegenüberliegenden Seite der lateralen Kanalöffnung an den Kanal (Sec61) angrenzt, wäre die hakenförmige luminaire Struktur zur rückwärtigen Aufnahme und Führung der Peptidkette in der Lage, wie sie bei dem in der Kristallstruktur von PglB dargestellten schlaufenförmigen Akzeptorpeptid erkennbar ist.

zytosolisch



membranal



luminal

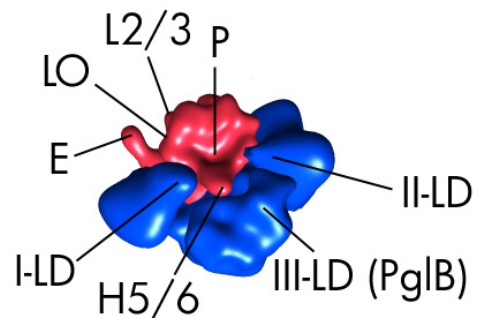
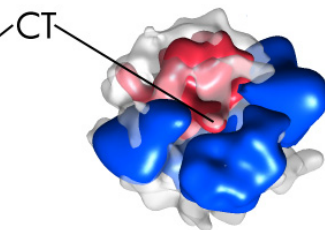
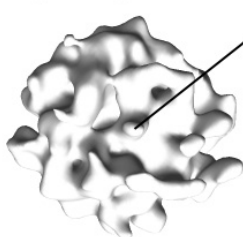


Abbildung 42: Hybridmodell des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons: Blau der Anteil der OST, Rot der Kanalanteil, Grün das Akzeptorpeptid gebunden an Stt3p (PglB), Weiss zum Vergleich das isolierte OST-Sec61-Translokon, zentraler Dorn (CT), Domänen I, II, III der OST, luminale Domäne (LD), Pore (P), laterale Öffnung (LO), Scharnier (H5/6), Loops (L2/3, L6/7, L8/9), γ -Untereinheit des Sec61-Komplexes (E, SecE).

4 Diskussion

Die Oligosaccharyltransferase (OST) ließ sich wie auch der Sec61-Komplex und Ribosomen bzw. Ribosomen mit naszierender Proteinkette (RNCs) präparieren. Es wurden die Bindung und Sättigung des OST-Sec61-Ribosomen-Komplexes charakterisiert.

Aus den (kryo)elektronenmikroskopischen 2D-Messwerten konnten die 3D-Strukturen der OST und des OST-Sec61-RNC-Komplexes errechnet werden.

Zusammen mit dem bisherigen Stand der Wissenschaft ergeben sie ein neuartiges, auf einer vermutlich alternativen Bindung des proteinleitenden Kanals beruhendes Gesamtbild: ein 3D-Modell des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons.

4.1 Zur Präparation und Charakterisierung

Nachdem gezeigt wurde, dass auch in *Saccharomyces cerevisiae* die Oligosaccharyltransferase (OST) wie erwartet (vgl. 1.1) ein ribosomenassoziiertes Membranprotein (RAMP) ist (vgl. 3.1), stand der Weg offen, den OST-Sec61-Ribosomenkomplex zu präparieren (vgl. 3.4.1). Ribosomen, RNCs (vgl. 3.2.3) und der Sec61-Komplex (vgl. 3.2.2) konnten nach etablierten und optimierten Protokollen gewonnen werden. Die OST wurde nach dem so hier erstmals zusammengestellten Protokoll erfolgreich präpariert (vgl. 3.2.1). Interessant war die vierfach höhere Stoffmengenausbeute an Sec61-Komplex im Verhältnis zur OST bezogen auf ER-Membranen (8,1 fmol/eq zu 2 fmol/eq; zur Definition des „eq“ siehe Kelleher und Gilmore, 1994), was vermutlich auf die unterschiedliche Viabilität der beiden eingesetzten Stämme zurückzuführen ist. Ansonsten spräche es für eine bevorzugt posttranslationale Translokation (dafür ist der heptamere Komplex zuständig; vgl. 2.1.7) der benutzten Hefestämme, wobei aber die mangelnde Vergleichbarkeit der Zusammensetzung der ER-Membranen berücksichtigt werden sollte.

Durch das Binden des Sec61-Komplexes und/oder der OST an Ribosomen (vgl. 3.2.4, Abbildung 22) konnte im Umkehrschluss auch die Qualität der entsprechenden Präparationen bestätigt werden. Für den Sec61-Komplex war dies erwartet worden (vgl. 1.1.1), für die OST konnte es hier nun auch gezeigt werden (vgl. 1.1.2).

Erstmals konnte die Bindungskonstante $K_D = 12,8 \text{ nM}$ (vgl. 3.2.4, Abbildung 23) für die spezifische Bindung der OST an einen Ribosomen-Sec61-Komplex zum Ribosomen-Sec61-OST-Komplex bestimmt werden. Sie liegt in der gleichen Größenordnung wie die hochaffine Bindung des Sec61-Komplexes an Ribosomen (vgl. 1.1.1), was die Bedeutung der OST für die Assoziation mit dem Sec61-Komplex und die Bindung an das Ribosom unterstreicht. Es lässt sich abschätzen, dass eine OST pro Ribosom bindet, was in Übereinstimmung mit früheren biochemischen Experimenten zu den Ribophorinen ist (vgl. 1.1.2).

4.2 Zu den 3D-Strukturen

Die Struktur der Oligosaccharyltransferase (vgl. 3.3) bildet die Grundlage für die anschließende Modellentwicklung anhand der erstmals vorgestellten 3D-Struktur des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons (vgl. 3.4).

4.2.1 Zur 3D-Struktur der Oligosaccharyltransferase

Aus dem Hybridmodell der OST (vgl. 3.3.5), entstanden durch das vollständige Docken des Stt3p-Homologs PglB in die Gesamtstruktur mit einer ausgezeichneten Korrelation von 0,95 (vgl. 3.3.4), lässt sich erkennen, dass das Rückgrat (der Handrücken und der Handballen zusammengefasst zur Domäne III) offensichtlich komplett abgebildet wurde. Die Rückgratstruktur der OST weist damit höchstens eine minimale Flexibilität gegenüber der PglB-Struktur auf. Aufgrund der Homogenität der Probe (vgl. 3.3.1, Abbildung 24) stand für die Strukturuntersuchungen eine weitgehend einheitliche OST zur Verfügung.

Der fehlende Anteil von 17 bis 30 % (vgl. 3.3.4) bezogen auf das erwartete Gesamtvolumen dürfte in der Variabilität der Finger I und II zu finden sein, was sich nicht sofort aus der Datenanalyse erkennen ließ (vgl. 3.3.2, Abbildung 25). Wahrscheinlich haben hier die unterschiedlichen Partikelorientierungen die 2D-Analyse (vgl. 3.3.2, Abbildung 25 und vgl. 3.3.3, Abbildung 28) überlagert, wie es aus den drei RCT-Partialrekonstruktionen (Abbildung 26) ersichtlich ist. Diese drei Teilrekonstruktionen zeigen aber auch, dass die Finger I und II eine gewisse Beweglichkeit aufweisen, die ähnlich auch für eine Kryo-EM-Struktur der OST beobachtet wurde (vgl. 1.1.2, Abbildung 11).

Betrachtet man die CL-Struktur der OST (vgl. 3.3.3, Abbildung 29), so könnten Stainartefakte die aus der Flexibilität der Finger I und II herrührende Delokalisierung der zu erwartenden Dichte noch verstärkt haben. In den Fingern I und II müssten sich die weiteren OST-Untereinheiten (vgl. 1.1.2) verteilen. Insbesondere die luminalen Anteile würden damit die chaperonartigen Ost1p und Ost3p enthalten. Inwieweit der Subkomplex Ost2p-Wbp1p-Swp1p noch die verbliebenen ca. 10 % des Handrückens (vgl. 3.3.5, Abbildung 32) transmembranal ausfüllt, wie es in Relation zur postulierten Funktion als Regulator des dolicholgebundenen Oligosaccharids zu erwarten wäre, kann bei der erreichten Auflösung und ohne Kenntnis weiterer Kristallstrukturen nur gemutmaßt werden. Das Hybridmodell dürfte sich anhand der gedockten PglB-Struktur leichter in Relation zum Sec61-Komplex in einem OST-Sec61-Translokon orientieren lassen. Insbesondere, da die hier wohl vorliegende Kernstruktur einfacher zu

untergliedern war, als es mit der sehr voluminösen 3D-Struktur (vgl. Abbildung 12) aufgrund der Mizelle (vgl. 1.1.2) möglich gewesen wäre.

4.2.2 Zur 3D-Struktur des OST-Sec61-Ribosom-Komplexes

Der hier erstmals beschriebene definierte OST-Sec61-RNC-Komplex (vgl. 3.4, 3.4.1) weist entscheidende markante strukturelle Besonderheiten der Translokondichte auf:

Zum einen findet sich anders als bei den bisherigen Strukturen (vgl. 1.1.1) genau eine dezentrale porenförmige Vertiefung (vgl. Abbildung 39), die von sechs – davon zwei neuen (C5, C6) – Verbindungen (Benennung nach Beckmann *et al.*, 2001; vgl. auch Becker, 2007) und einer Pseudoverbindung (vgl. 3.4.2) kreisförmig umringt wird (vgl. 3.4.2 und 3.4.3). Dabei ist die stärkste der ringförmig angeordneten Verbindungen (C3) eine deutlich andere als die bisherige (C4). Zusammen mit der größten außerhalb des Ringes liegenden Verbindung (C1) läge hier eine Ähnlichkeit zu der von Mitra *et al.* (Mitra *et al.*, 2005) untersuchten Struktur eines ans Ribosom gebundenen SecYEG-Dimers (nicht abgebildet) vor, wenn nicht die kreisrunde Form in der Membranebene (vgl. 3.4.2), insbesondere die Lage der einzelnen porenförmige Vertiefung, als auch die weiteren beobachteten Verbindungen dagegen sprächen. Desweiteren erreichte das OST-Sec61-Translokon eine vertikale Ausdehnung von bis zu 70 Å (vgl. 3.4.2), was bei einer Membranstärke von ~40 Å für luminale Translokonanteile spricht, die aber keine definierte Struktur erkennen ließen. Erkennen konnte man dies erst nach der zweiten Sortierung (vgl. 3.4.1, Abbildung 34), wobei aussortierte leere Ribosomen, d.h. ohne erkennbare t-RNA-Dichte, nach einigen Runden Refinement eine schwachen Kanaldichte ähnlich der Struktur von Beckmann *et al.* (Beckmann *et al.*, 1997) zeigten (nicht abgebildet), da die Translokondichte wohl ein stärkeres Sortiersignal als die t-RNA-Dichte der ersten Sortierung darstellt. Daraus lässt sich ableiten, dass die luminalen Translokonanteile nur bei aktiven Ribosom-Kanal-Komplexen (also RNCs, vgl. 3.2.3) zu finden waren. Schließlich konnte ES27 (vgl. 3.4.1, Abbildung 35) wohl aufgrund der hier zusätzlich vorhandenen Translokondichte nicht mit der Kanalstruktur interferieren (vgl. a. Becker, 2007). Das alles sollte auf die Anwesenheit der OST zurückzuführen sein, da es bei Ribosomen-Sec61/YE-Komplexen oder Ribosomenkomplexen mit nativen Membranen so noch nie beobachtet wurde (vgl. 1.1.1) und die OST luminale Anteile hat (vgl. 1.1.2, Abbildung 10, A).

Demgegenüber weist die gut ausgebildete klar definierte Ribosomenstruktur keine Besonderheiten auf und lässt die Peptidyl-t-RNA und prominente ribosomale Features gut erkennen (vgl. 3.4.1, Abbildung 35). Sie ist damit den bisherigen Strukturen (vgl. 1.1.1) ähnlich.

Bei einer Membranfläche von ca. 7000 \AA^2 würden sich ein Sec61-Komplex und eine OST einfügen lassen (vgl. 3.4.3). Das bedeutet, dass nur eine kleine Mizelle ähnlich der bereits beschriebenen vorstellbar wäre (3.4.3; vgl. 1.1.1, Abbildung 9, A *vs.* B), was man anhand der gleichbleibenden Konturierung (vgl. 3.4.1) der Ribosom-Sec61-OST-Struktur vermuten kann. Gegen eine große voluminöse Mizelle spricht auch die dezentrale porenförmige Vertiefung, und dass die Translokonstruktur für einen Sec61-Komplex zu groß wäre (vgl. Becker *et al.*, 2009). Alternativ einzufügende weitere Sec61-Komplexe könnten wohl kaum die Besonderheiten der gefundenen Verbindungen und auf keinen Fall die luminale Dichte des hier diskutierten Translokons erklären.

4.3 Zur Modellentwicklung

Das OST-Sec61-Translokons lässt sich in zwei Bereiche unterteilen: erstens den Bereich um die porenförmige Vertiefung (P) mit den umgebenden Verbindungen zum Ribosom (C2 bis C6) sowie der Pseudoverbindung (PC) und zweitens den Restbereich mit der stärksten ribosomalen Verbindung (C1) (vgl. 3.4.3). Nach einem Vergleich der beobachteten Verbindungen des OST-Sec61-Translokons zum Ribosom mit der Lage des zu Sec61 homologen SSH-Kanals (3.4.3) wurde festgestellt, dass die Verbindungen nicht übereinstimmen und die porenförmige Vertiefung der gefundenen Translokonstruktur überdeckt würde. Daher wird hier eine alternative Bindungsposition des Sec61-Komplexes am Ribosom vermutet. In den ersten Bereich ließ sich genau ein (vgl. 1.1.1) homologer Sec61-Komplex anhand der porenförmigen Vertiefung, der starken C3-Verbindung und des Zentralen Dorns (CT) gut docken (vgl. 3.4.3, Abbildung 40; vgl. a. 3.4.4, Abbildung 42). Wie bereits erläutert (vgl. 3.4.3), könnte der Rest der Translokondichte von einer OST eingenommen werden, da die Struktur für einen Kanal mit Mizelle zu groß wäre.

4.3.1 Zum proteinleitenden Kanal im Modell

Erstmals ließ sich damit eine Struktur zeigen, bei der der proteinleitende Kanal mit dem Ribosom in dieser vermutlich alternativen Bindungsposition eine sehr dichte Verbindung (vgl. 3.4.2: Zugänge von nur 8 bis 12 Å) aufbauen sollte, die durch Ribosomen-Lipid-Verbindungen (vgl. Frauenfeld *et al.*, 2011) sogar ionendicht (vgl. 1.1.1) werden könnte. Es kann bei der erreichten Auflösung nicht ausgeschlossen werden, dass die Translokonstruktur von einer schwachen Mizelle umgeben ist (3.4.3). Da ein aktiver proteinleitender Kanal bei der Loop-Insertion des DP120-Signalpeptids (vgl. Beckmann *et al.*, 2001) lateral öffnen muss (vgl. 1.1.1), sollte in dieser Struktur ein geöffneter Sec61-Komplex vorliegen (vgl. 3.4.3). Darum ist spekulativ die zusätzliche randständige Dichte zwischen C5 und C6 dem His-HA-Tag zuzuschreiben und die sichtbare porenförmige Vertiefung könnte in Richtung der lateralen Öffnung (LO) durch die naszierende Proteinkette und den Signalanker begrenzt werden (vgl. 3.4.3). Damit gäbe es einen direkten Weg für naszierende Membranproteine zur Insertion in die das OST-Sec61-Translokons umgebende Lipiddoppelschicht (Abbildung 43, Grün, von P in Richtung LO). Dieser Weg würde auch die Richtung zur Insertion zytosolischer Proteinschlaufen (vgl. a. Beckmann *et al.*, 2001) vorgeben. Die ribosomalen Verbindungen könnten auch einer Arretierung des Sec61-Komplex in der geöffneten Konformation dienen, wenn man die künstliche Puromycin-induzierte Ionendurchlässigkeit (vgl. 1.1.1) bedenkt.

Anhand dieser Prämisse wurde versucht abzuschätzen, welche Bereiche des Sec61-Komplexes (Abbildung 43, Rot) Anteil an den beobachteten ribosomalen Verbindungen haben könnten (vgl. Tabelle 2 mit Tabelle 3). Der Hauptverbindung C3 müssten die für die Kanalbindung wichtigen Loops L6/7 und L8/9 (vgl. 1.1.1) zugeordnet werden. Damit wäre der C-Terminus von Sec61p vorstellbar an der Verbindung (vgl. 1.1.1) C2 beteiligt und könnte zusammen mit dem Loop L6/7 die naszierende Kette zur Translokation leiten (vgl. 1.1.1). Hingegen würde der Bereich des universellen ribosomalen Adapters und der vormals stärksten Verbindung C4 (vgl. 1.1.1) nunmehr die β -Untereinheit des Sec61-Komplexes binden, was nahelegen würde, dass die dort zu verortende Signalpeptidase (vgl. 1.1.1) ob direkt oder indirekt über den Adapter reguliert werden könnte. Die für die erstmals beobachteten Verbindungen C5 und C6 und die Pseudoverbindung strukturell zugeordneten Kanalbereiche bedürfen weiterer experimenteller Untersuchungen.

4.3.2 Zur Oligosaccharyltransferase im Modell

Somit sollte die Verbindung C1 klar der ans Ribosom bindenden OST (vgl. 3.2.4; vgl. 1.1; vgl. 1.1.2; Abbildung 43, Blau) zuzuordnen sein. Das erfolgreiche automatische Docken des Stt3p-Homologs PglB in die Restdichte (vgl. 3.4.3; Abbildung 40; vgl. Tabelle 3) bestätigt diese These. Durch das bündige Anschließen an die gedockte Kanaldichte in der Translokondichte deutet alles darauf hin, dass hiermit eine biologisch relevante Subkomplexstruktur dargestellt sein sollte, insbesondere die strukturelle Beziehung der katalytischen Untereinheit der OST (vgl. 1.1.2) zum Sec61-Komplex. Die luminal Translokondichte war leider nicht hoch genug aufgelöst, die hakenförmige Domäne (vgl. 1.1.2; Abbildung 12) von Stt3p (PglB) erkennen zu lassen, was auf die Interaktion mit weiteren luminalen Domänen der OST zurückzuführen sein sollte oder am Rauschen gelegen haben könnte. In der membranalen Aufsicht verbleibt noch eine links, rechts und rückwärtig nicht zugewiesene Dichte (vgl. 3.4.3; Abbildung 40), wo die restlichen Untereinheiten der OST anzuordnen wären, wobei der Randbereich der Translokonstruktur auch eine schwache Mizelle sein könnte (3.4.3). Dass die OST sich in dieser Position relativ zum Ribosom befindet entspricht dem Befund (vgl. Harada *et al.*, 2009) und erscheint angesichts der Verhinderung des Targetings zur Translokation durch Anti-Ribophorin-Antikörper (vgl. 1.1.2) plausibel. Inwieweit die OST einen gemeinsamen oder alleinigen Anteil an den dem Sec61-Komplex zugeschriebenen Verbindungen (vgl. Tabelle 3) hat, müssen weitere Experimente zeigen.

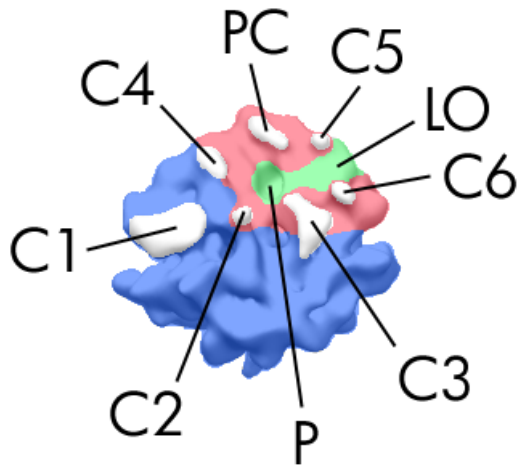


Abbildung 43: Darstellung des farbkodierten OST-Sec61-Translokons in membranaler Aufsicht: Naszierende Proteinkette (Grün), Sec61-Komplex (Rot), OST (Blau), Verbindungen (C1 bis C6 und, Weiss), Pseudoverbindung (PC, Weiss), porenförmige Vertiefung (P).

4.3.3 Zur Koordination

Wie aber lässt sich der Widerspruch (vgl. Abbildung 43) zum Organisationsmodell des OST-Sec61-Komplexes (vgl. 1.1.2, Abbildung 10, C) auflösen, in dem die OST an der lateralen Öffnung des Sec61-Komplexes angeordnet wurde? Da Chavan *et al.* (Chavan *et al.*, 2005) alle relevanten Interaktionsmodelle/-experimente zitieren (vgl. insbes. Abbildung 10, A, B1 und B2) und somit einbeziehen sollten, erscheint dies als ein geeigneter Ausgangspunkt. Angemerkt wurde, dass das Split-Ubiquitin-System hinsichtlich seiner Auflösungsgenauigkeit nicht ausreichend getestet wurde und die chemische Quervernetzung oder die Koimmunopräzipitation von Untereinheiten auch indirekt über Mittlerproteine erfolgen könnte (Chavan und Lennarz, 2006). Das bedeutet, dass die *in vivo* Split-Ubiquitin-Daten wohl einen größeren Interpretationsspielraum haben, wohingegen die *in vitro* Vernetzung bzw. Fällung kritischer betrachtet werden müsste, z.B. auch hinsichtlich intermolekularer Interaktionen (vgl. die Vernetzbarkeit der Homologen Ost3p-Ost6p in Yan *et al.*, 2003; vgl. 1.1.2 bzgl. der Widersprüche). Bei genauerer Betrachtung der Daten (Chavan *et al.*, 2005), zeigte sich, dass aufgrund des Sec61p-Cub-PLV Konstruktes die OST relativ zum getaggten C-Terminus des Sec61p anzuordnen ist, d.h. gegenüber der lateralen Kanalöffnung. In erster Näherung entspräche das einer Spiegelung der Anordnung der OST-Untereinheiten an der Achse Sbh1p-Sss1p (Sec61 β - γ : Abbildung 10, C). Anhand der gegebenen Interaktionsprofile wurde versucht, die OST-Untereinheiten in Relation zum Sec61-Komplex unter Zugrundelegung seiner Struktur anzuordnen (Abbildung 44). Das Ergebnis entspricht in der Gruppierung der

Untereinheiten (Ost2p, Ost3p, Ost4p, Wbp1p/Stt3p/Ost1p, Ost5p, Swp1p) dem Chavan-Modell (Abbildung 10, C), weicht aber aufgrund der Anordnung innerhalb selbiger davon ab. Wegen der Möglichkeit luminaler und intermolekularer Quervernetzungen und damit möglicher falsch-positiver Interaktionen wurden die Daten von Yan *et al.* (Yan *et al.*, 2003; vgl. Abbildung 10, B1) nicht genutzt, das neuentwickelte membrantopologische OST-Sec61-Koordinationsmodell (Abbildung 44) weiter zu konkretisieren. Nun interagiert wohl Ost4p nicht mit Ost1p und Ost5p nicht mit Wbp1p und Swp1p (Yan *et al.*, 2005; vgl. Abbildung 12, B2) und auch mögliche falsch-positive Ergebnisse des Split-Ubiquitin-Systems (vgl. 1.1.2) können hier nicht erkannt werden, so dass von einer Verfeinerung des Modells Abstand genommen wurde.

Es lässt sich jedoch feststellen, dass das Modell (Abbildung 44) grundsätzlich in Übereinstimmung mit unserem Befund des OST-Sec61-Translokons (vgl. Abbildung 43) ist. Denkbar wäre z.B., dass Ost2p und Wbp1p hinter Stt3p angeordnet werden, d.h. zum Rand des Translokons hin. Auch sind die postulierten drei Subkomplexe der OST (vgl. Abbildung 10, A) ansatzweise erkennbar. Zudem befinden sich Wbp1p-Swp1p-Ost1p, wie beobachtet (vgl. Abbildung 12, B), in räumlicher Nähe.

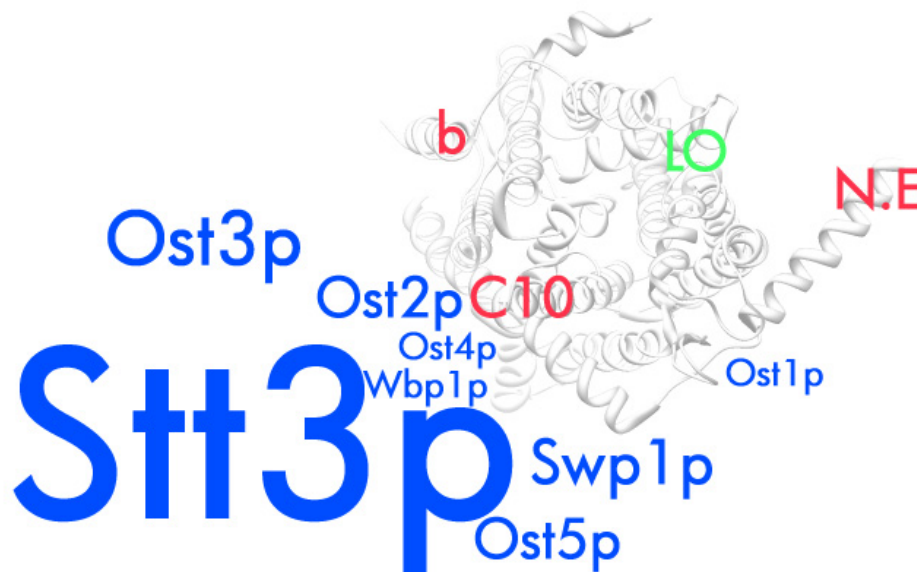


Abbildung 44: Neue Interpretation des Koordinationsexperiments zum OST-Sec61-Komplex (hergeleitet aus Chavan *et al.*, 2005; vgl. Abbildung 10, C): Helixmodell des SecYE β -Monomers (Weiss; van den Berg *et al.*, 2004), C-Terminus von SecY (C10, Rot), N-Terminus von SecE (N.E., Rot), Sec β (b, Rot), laterale Öffnung (LO, Grün), OST-Untereinheiten (relative Membrananteile anhand der Bezeichnungsgröße, Blau).

4.3.4 Zu den Modelldetails

Da wir die Anordnung der Stt3p-Untereinheit (d.h. des Homologs PglB) in der Gesamtstruktur der OST gefunden hatten (vgl. 3.3.5, Abbildung 33) und ebenso die Lage im Translokon in Bezug zum alternativ angeordneten Sec61-Komplex feststellen konnten (vgl. 3.4.3, Abbildung 40), ließen sich die Finger I und II des OST-Hybridmodells nun manuell in die verbleibende Translokondichte docken (vgl. 3.4.4, Abbildung 42). Für den Finger I gelang dies mit gutem Erfolg. Der Finger II müsste wahrscheinlich umgeformt werden, d.h. sich strukturell rearrangieren, um eben solche Werte zu erreichen. Dies spricht sehr stark für eine Flexibilität der OST in diesem Bereich, was mit der Anpassung der isolierten OST an den Sec61 zusammenhängen könnte und damit auch einige Besonderheiten der Organisationsmodelle (vgl. 1.1.2, Abbildung 11) erklären könnte. Mit dem alternativ erstellten Organisationsmodell des OST-Sec61-Komplexes (vgl. 4.3.2; Abbildung 43) lassen sich die Ergebnisse der Neuinterpretation des Koordinationsmodells (vgl. 4.3.3; Abbildung 44) nun verknüpfen:

Ost3p würde sich wie vermutet (vgl. 1.1.2) in der Nähe der β -Untereinheit des Sec61 befinden und müsste dem Finger II des OST-Hybridmodells (vgl. 3.3.5, Abbildung 32) zugeordnet werden. Bemerkenswerterweise wäre die luminal Domäne von Ost3p dort zu erwarten, wo sich im *Mammalia* System das zu Ost3p homologe TRAP α (vgl. 1.1.2) befindet (vgl. Ménétret *et al.*, 2008; Abbildung 9, A). Ost1p würde folglich dem Finger I (vgl. 3.3.5, Abbildung 32) zuzuordnen sein. Insbesondere Swp1p befände sich neben Wbp1p (vgl. 1.1.2) in der unmittelbaren Nähe der den lipidgebundenen Oligosaccharid-Donor aufnehmenden Tasche von Stt3p (vgl. 1.1.2, Abbildung 12, A). Der Knick in Ost4p (vgl. 1.1.2, Abbildung 12, B) könnte auf Anordnung in der OST nahe der γ -Untereinheit des Sec61 (Abbildung 44; Abbildung 9, SecE) zurückzuführen sein. Sowohl die luminal Domäne von Ost1p (I-LD) als auch die von Ost3p (II-LD) könnten damit durch ihre Nähe zum naszierenden Polypeptid (40 Å Zone) als Chaperon (vgl. 1.1.2) aktiv werden, wobei ihre vollständige Struktur (vgl. 3.3.4) noch umfangreicher sein sollte. Dazu grenzen beide eng an die hakenförmige Domäne (III-LD) der katalytisch aktiven Untereinheit Stt3p an. Eine naszierende Proteinkette würde schlaufenförmig innerhalb von Stt3p im minimalen Abstand von 40 Å ab Eintritt in das ER am katalytischen Zentrum vorbeigeführt werden, was in Übereinstimmung mit den beobachteten Glykosylierungsabständen ist (vgl. 1.1.2). Die Signalpeptidase könnte dann beginnend mit der Sec β Interaktion (vgl. 1.1.1) parallel zum Weg der naszierenden Transmembranhelices im proteinleitenden Kanal (vgl. Abbildung 43, grün) angeordnet sein (also parallel zu dem 3D-Modell in Abbildung 45), wodurch sie dem aktiven Zentrum der OST gegenüberliegend wäre, was die sequentielle Zusammenarbeit beider (vgl. 1.1) erklären würde.

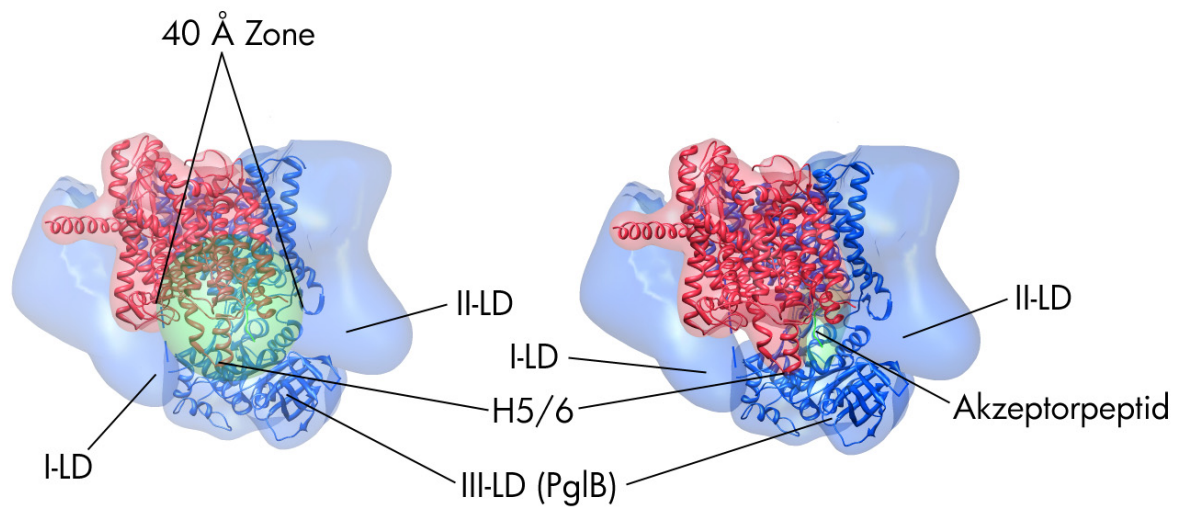


Abbildung 45: 3D-Modell des Ribosomen-gebundenen OST-Sec61-Translokons in membranaler Sicht: OST (Blau), Stt3p (PglB in Ribbonform), luminale Domänen (LD; Nummerierung vgl. 3.2.5), Sec61 (Rot, SecYE β in Ribbonform), Scharnierregion (H5/6), glykosylierbares Akzeptorpeptid (Grün).

4.4 Ausblick

Die erzielten Ergebnisse liefern einen neuen Beitrag zum Verständnis des Zusammenspiels der Oligosaccharyltransferase mit einem alternativ positionierten proteinleitenden Kanal bei der kotranslationalen Translokation in das Endoplasmatische Retikulum durch das Ribosom.

Nun könnten die erhaltenen 3D-Strukturen höher aufgelöst und detaillierter interpretiert werden.

In die Zukunft gerichtet bleibt zu klären, wie die Biogenese des Translokons erfolgt.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roland Beckmann, dass ich eine anspruchsvolle komplexe strukturbioologische Aufgabe mittels einer State-of-the-Art Technologie erfolgreich lösen durfte. Hervorheben möchte ich die offene optimistisch vorwärts gerichtete Arbeitsatmosphäre der Gruppe.

Mein besonderer Dank für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation gebührt Herrn Prof. Dr. Christian Spahn.

Vielmals danke ich Herrn Dr. Thomas Becker für die freundliche Überlassung einiger wichtiger Reagenzien und den konstruktiven Anmerkungen zu meinem Manuskript. Dank auch an Herrn Prof. Dr. Mario Halic für die Computerunterstützung.

Herrn Dr. Thorsten Mielke danke ich für die exzellente Bereitstellung der Ausrüstung für die Datensammlung, mithin auch Herrn Dr. Rudi Lurz und Frau Gerhild Lüders. Das Gleiche gilt auch Herrn Dr. Christoph Böttcher.

Nicht minder bedanke ich mich bei Frau Marlies Hoffmann und Frau Sylvia Pötzsch.

Herrn Prof. Dr. Burkhardt Dahmann und Herrn Dr. Peter Jungblut danke ich für die kurzfristige Zusammenarbeit außerhalb meiner Promotion.

Nicht Vergessen möchte ich die fachliche und überfachliche Inspiration, z.B. bei einem Espresso oder bei 3D-Anwendungen, von: Frau Prof. Dr. Cordula Enenkel, Frau Dr. Petra Wendler, Frau Andrea Lehmann und den Herren Alex Kloth, Dr. Jan Giesebrecht, Dr. Matthias Walther.

Ohne die offenherzige und freizügige Aufnahme durch Herrn Prof. Dr. Peter-Michael Klötzel wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Der Volkswagenstiftung sei Dank für die Förderung.

Schlussendlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden.

Literatur

Bause *et al.*, 1997

Bause, E., Wesemann, M., Bartoschek, A., Breuer, W.: Epoxyethylglycyl peptides as inhibitors of oligosaccharyltransferase: double-labelling of the active site. *Biochem J.* 1997, 322 (Pt 1), S.95-102.

Becker *et al.*, 2009

Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J.P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., Westhof, E., Gilmore, R., Mandon, E.C., Beckmann, R.: Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science.* 2009, 326(5958), S.1369-73.

Becker, 2007

Becker, T.: Hrsg.: Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I: Strukturen von eEF3 und Sec61 als aktive ribosomale Liganden. Berlin, 2007
<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/becker-thomas-2006-04-24/PDF/becker.pdf>.

Beckmann *et al.*, 2001

Beckmann, R., Spahn, C.M., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P.A., Sali, A., Frank, J., Blobel, G.: Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell.* 2001, 107(3), S.361-72.

Beckmann *et al.* (CSH), 2001

Beckmann, R., Spahn, C.M., Frank, J., Blobel, G.: The active 80S ribosome-Sec61 complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2001, 66, S.543-54.

Beckmann *et al.*, 1997

Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., Frank, J.: Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science.* 1997, 278(5346), S.2123-6.

Beckmann, 2002

Beckmann, R.: Kalt erwischt: 3D-Momentaufnahmen der Proteintranslokation durch Kryo-Elektronenmikroskopie. *Nachrichten aus der Chemie.* 2002, 50, S.136–141.

Blau *et al.*, 2005

Blau, M., Mullanpudi, S., Becker, T., Dudek, J., Zimmermann, R., Penczek, P.A., Beckmann, R.: ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat Struct Mol Biol.* 2005, 12(11), S.1015-6.

Blobel und Dobberstein (I), 1975

Blobel, G., Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* 1975, 67(3), S.835-51.

Blobel und Dobberstein (II), 1975

Blobel, G., Dobberstein, B.: Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol.* 1975, 67(3), S.852-62.

Blobel und Sabatini, 1971

Blobel, G., Sabatini, D.D.: Ribosome-membrane interactions in eukaryotic cells. Hrsg.: L.A. Manson: Biomembranes, Vol. 2. Plenum Publishing Corp., New York, 1971 S.193-195.

Blobel, 1980

Blobel, G.: Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980, 77(3), S.1496-500.

Blobel, 2000

Blobel, G.: Protein targeting (Nobel lecture). *Chembiochem.* 2000, 1(2), S.86-102.

Cannon *et al.*, 2005

Cannon, K.S., Or, E., Clemons, W.M. Jr., Shibata, Y., Rapoport, T.A.: Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol.* 2005, 169(2), S.219-25.

Castro *et al.*, 2006

Castro, O., Movsichoff, F., Parodi, A.J.: Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(40), S.14756-60.

Chavan *et al.*, 2005

Chavan, M., Yan, A., Lennarz, W.J.: Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex. *J Biol Chem.* 2005, 280(24), S.22917-24.

Chavan *et al.*, 2006

Chavan, M., Chen, Z., Li, G., Schindelin, H., Lennarz, W.J., Li, H.: Dimeric organization of the yeast oligosaccharyl transferase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(24), S.8947-52.

Chavan und Lennarz, 2006

Chavan, M., Lennarz, W.: The molecular basis of coupling of translocation and N-glycosylation. *Trends Biochem Sci.* 2006, 31(1), S.17-20.

Chen *et al.*, 2001

Chen, X., VanValkenburgh, C., Liang, H., Fang, H., Green, N.: Signal peptidase and oligosaccharyltransferase interact in a sequential and dependent manner within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2001, 276(4), S.2411-6.

Cheng *et al.*, 2005

Cheng, Z., Jiang, Y., Mandon, E.C., Gilmore, R.: Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation. *J Cell Biol.* 2005, 168(1), S.67-77.

Chiba *et al.*, 2002

Chiba, K., Mori, H., Ito, K.: Roles of the C-terminal end of SecY in protein translocation and viability of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2002, 184(8), S.2243-50.

Crowley *et al.*, 1993

Crowley, K.S., Reinhart, G.D., Johnson, A.E.: The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell.* 1993, 73(6), S.1101-15.

Crowley *et al.*, 1994

Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., Johnson, A.E.: Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell.* 1994, 78(3), S.461-71.

De Carlo und Harris, 2011

De Carlo, S., Harris, J.R.: Negative staining and cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM. *Micron.* 2011, 42(2), S.117-31.

DeRosier und Klug, 1968

DeRosier, D.J., Klug, A.: Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature.* 1968, 217, S.130-134.

Dubochet *et al.*, 1988

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P.: Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys.* 1988, 21(2), S.129-228.

Egea und Stroud, 2010

Egea, P.F., Stroud, R.M.: Lateral opening of a translocon upon entry of protein suggests the mechanism of insertion into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, 107(40), S.17182-7.

Engelman und Steitz, 1981

Engelman, D.M., Steitz, T.A.: The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: the helical hairpin hypothesis. *Cell*. 1981, 23(2), S.411-22.

Evans *et al.*, 1986

Evans, E.A., Gilmore, R., Blobel, G.: Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986, 83(3), S.581-5.

Fiaux *et al.*, 2002

Fiaux, J., Bertelsen, E.B., Horwich, A.L., Wüthrich, K.: NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature*. 2002, 418(6894), S.207-11.

Fons *et al.*, 2003

Fons, R.D., Bogert, B.A., Hegde, R.S.: Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol*. 2003, 160(4), S.529-39.

Frank *et al.*, 1996

Frank, J., Rademacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., Leith, A.: SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*. 1996, 116(1), S.190-9.

Frank, 1996

Frank, J.: *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. 1, San Diego, Academic Press, 1996 978-0122650406.

Frank, 1998

Frank, J.: How the Ribosome Works. *Am Sci*. 1998, 86(5), S.428-439.

Frank, 2002

Frank, J.: Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2002, 31, S.303-19.

Frauenfeld *et al.*, 2011

Frauenfeld, J., Gumbart, J., Sluis, E.O., Funes, S., Gartmann, M., Beatrix, B., Mielke, T., Berninghausen, O., Becker, T., Schulten, K., Beckmann, R.: Cryo-EM structure of the

ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol.* 2011, 18(5), S.614-21.

Frauenfeld, 2011

Frauenfeld, J.: Hrsg.: LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie: The ribosome-SecYEG complex in the membrane environment. München, 2011 http://edoc.ub.uni-muenchen.de/12950/1/Frauenfeld_Jens.pdf.

Fu *et al.*, 1997

Fu, J., Ren, M., Kreibich, G.: Interactions among subunits of the oligosaccharyltransferase complex. *J Biol Chem.* 1997, 272(47), S.29687-92.

Giddings und Staehelin, 1980

Giddings, T.H. Jr., Staehelin, L.A.: Ribosome binding sites visualized on freeze-fractured membranes of the rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1980, 85(1), S.147-52.

Gilmore *et al.*, 1982

Gilmore, R., Walter, P., Blobel, G.: Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol.* 1982, 95(2 Pt 1), S.470-7.

Görlich *et al.*, 1992

Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K.U., Rapoport, T.A.: A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell.* 1992, 71(3), S.489-503.

Görlich und Rapoport, 1993

Görlich, D., Rapoport, T.A.: Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* 1993, 75(4), S.615-30.

Gumbart *et al.*, 2009

Gumbart, J., Trabuco, L.G., Schreiner, E., Villa, E., Schulten, K.: Regulation of the protein-conducting channel by a bound ribosome. *Structure.* 2009, 17(11), S.1453-64.

Gumbart und Schulten, 2007

Gumbart, J., Schulten, K.: Structural determinants of lateral gate opening in the protein translocon. *Biochemistry.* 2007, 46(39), S.11147-57.

Halic und Beckmann, 2005

Halic, M., Beckmann, R.: The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol.* 2005, 15(1), S.116-25.

Hamman *et al.*, 1997

Hamman, B.D., Chen, J.C., Johnson, E.E., Johnson, A.E.: The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell.* 1997, 89(4), S.535-44.

Harada *et al.*, 2009

Harada, Y., Li, H., Li, H., Lennarz, W.J.: Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106(17), S.6945-9.

Harris und Silhavy, 1999

Harris, C.R., Silhavy, T.J.: Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and *in vivo* cross-linking. *J Bacteriol.* 1999, 181(11), S.3438-44.

Hartmann *et al.*, 1993

Hartmann, E., Görlich, D., Kostka, S., Otto, A., Kraft, R., Knespel, S., Bürger, E., Rapoport, T.A., Prehn, S.: A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem.* 1993, 214(2), S.375-81.

Hedge *et al.*, 1998

Hegde, R.S., Voigt, S., Rapoport, T.A., Lingappa, V.R.: TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1998, 92(5), S.621-31.

Heinrich *et al.*, 2000

Heinrich, S.U., Mothes, W., Brunner, J., Rapoport, T.A.: The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell.* 2000, 102(2), S.233-44.

Helenius und Aebi, 2001

Helenius, A., Aebi, M.: Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* 2001, 291(5512), S.2364-9.

Helenius und Aebi, 2004

Helenius, A., Aebi, M.: Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.* 2004, 73, S.1019-49.

Helmers *et al.*, 2003

Helmers, J., Schmidt, D., Glavy, J.S., Blobel, G., Schwartz, T.: The beta-subunit of the protein-conducting channel of the endoplasmic reticulum functions as the guanine nucleotide exchange factor for the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *J Biol Chem.* 2003, 278(26), S.23686-90.

Heritage und Wonderlin, 2001

Heritage, D., Wonderlin, W.F.: Translocon pores in the endoplasmic reticulum are permeable to a neutral, polar molecule. *J Biol Chem.* 2001, 276(25), S.22655-62.

High *et al.*, 1993

High, S., Andersen, S.S., Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B.: Sec61p is adjacent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion. *J Cell Biol.* 1993, 121(4), S.743-50.

Hug und Feldman, 2011

Hug, I., Feldman, M.F.: Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology.* 2011, 21(2), S.138-51.

Ismail *et al.*, 2008

Ismail, N., Crawshaw, S.G., Cross, B.C., Haagsma, A.C., High, S.: Specific transmembrane segments are selectively delayed at the ER translocon during opsin biogenesis. *Biochem J.* 2008, 411(3), S.495-506.

Jamaluddin *et al.*, 2011

Jamaluddin, M.F., Bailey, U.M., Tan, N.Y., Stark, A.P., Schulz, B.L.: Polypeptide binding specificities of *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase accessory proteins Ost3p and Ost6p. *Protein Sci.* 2011, 20(5), S.849-55.

Jiang *et al.*, 2008

Jiang, Y., Cheng, Z., Mandon, E.C., Gilmore, R.: An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *J Cell Biol.* 2008, 180(6), S.1149-61.

Johnson und van Waes, 1999

Johnson, A.E., van Waes, M.A.: The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999, 15, S.799-842.

Jungnickel und Rapoport, 1995

Jungnickel, B., Rapoport, T.A.: A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* 1995, 82(2), S.261-70.

Kalies *et al.*, 1994

Kalies, K.U., Görlich, D., Rapoport, T.A.: Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol.* 1994, 126(4), S.925-34.

Kalies *et al.*, 1998

Kalies, K.U., Rapoport, T.A., Hartmann, E.: The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol.* 1998, 141(4), S.887-94.

Kalies *et al.*, 2008

Kalies, K.U., Stokes, V., Hartmann, E.: A single Sec61-complex functions as a protein-conducting channel. *Biochim Biophys Acta.* 2008, 1783(12), S.2375-83.

Karamyshev *et al.*, 2005

Karamyshev, A.L., Kelleher, D.J., Gilmore, R., Johnson, A.E., von Heijne, G., Nilsson, I.: Mapping the interaction of the STT3 subunit of the oligosaccharyl transferase complex with nascent polypeptide chains. *J Biol Chem.* 2005, 280(49), S.40489-93.

Karaoglu *et al.*, 1997

Karaoglu, D., Kelleher, D.J., Gilmore, R.: The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. *J Biol Chem.* 1997, 272(51), S.32513-20.

Kelleher *et al.*, 2007

Kelleher, D.J., Banerjee, S., Cura, A.J., Samuelson, J., Gilmore, R.: Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms. *J Cell Biol.* 2007, 177(1), S.29-37.

Kelleher und Gilmore, 1994

Kelleher, D.J., Gilmore, R.: The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J Biol Chem.* 1994, 269(17), S.12908-17.

Kelleher und Gilmore, 2006

Kelleher, D.J., Gilmore, R.: An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology.* 2006, 16(4), S.47R-62R.

Knauer und Lehle (BBA), 1999

Knauer, R., Lehle, L.: The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1426(2), S.259-73.

Knauer und Lehle (JBC), 1999

Knauer, R., Lehle, L.: The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. J Biol Chem. 1999, 274(24), S.17249-56.

Kowarik *et al.*, 2006

Kowarik, M., Numao, S., Feldman, M.F., Schulz, B.L., Callewaert, N., Kiermaier, E., Catrein, I., Aebi, M.: N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. Science. 2006, 314(5802), S.1148-50.

Kreibich *et al.* (JCB, Proteins I), 1978

Kreibich, G., Ulrich, B.L., Sabatini, D.D.: Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristics of rough microsomes. J Cell Biol. 1978, 77(2), S.464-87.

Kreibich *et al.* (JCB, Proteins II), 1978

Kreibich, G., Freienstein, C.M., Pereyra, B.N., Ulrich, B.L., Sabatini, D.D.: Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. II. Cross-linking of bound ribosomes to specific membrane proteins exposed at the binding sites. J Cell Biol. 1978, 77(2), S.488-506.

Kreibich *et al.*, 1978

Kreibich, G., Czako-Graham, M., Grebenau, R., Mok, W., Rodriguez-Boulan, E., Sabatini, D.D.: Characterization of the ribosomal binding site in rat liver rough microsomes: ribophorins I and II, two integral membrane proteins related to ribosome binding. J Supramol Struct. 1978, 8(3), S.279-302.

Laemmli, 1970

Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 1970, 227, S.680 - 685.

Lennarz, 2007

Lennarz, W.J.: Studies on oligosaccharyl transferase in yeast. Acta Biochim Pol. 2007, 54(4), S.673-7.

Levy *et al.*, 2001

Levy, R., Wiedmann, M., Kreibich, G.: *In vitro* binding of ribosomes to the beta subunit of the Sec61p protein translocation complex. J Biol Chem. 2001, 276(4), S.2340-6.

Li *et al.*, 2003

Li, G., Yan, Q., Oen, H.O., Lennarz, W.J.: A specific segment of the transmembrane

domain of Wbp1p is essential for its incorporation into the oligosaccharyl transferase complex. *Biochemistry*. 2003, 42(37), S.11032-9.

Li *et al.*, 2007

Li, W., Schulman, S., Boyd, D., Erlandson, K., Beckwith, J., Rapoport, T.A.: The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *Mol Cell*. 2007, 26(4), S.511-21.

Li *et al.*, 2008

Li, H., Chavan, M., Schindelin, H., Lennarz, W.J., Li, H.: Structure of the oligosaccharyl transferase complex at 12 Å resolution. *Structure*. 2008, 16(3), S.432-40.

Liao *et al.*, 1997

Liao, S., Lin, J., Do, H., Johnson, A.E.: Both lumenal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell*. 1997, 90(1), S.31-41.

Lizak *et al.*, 2011

Lizak, C., Gerber, S., Numao, S., Aebi, M., Locher, K.P.: X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature*. 2011, 474(7351), S.350-5. doi: 10.1038/nature10151.

Lucić *et al.*, 2005

Lucić, V., Förster, F., Baumeister, W.: Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem*. 2005, 74, S.833-65.

Martínez-Gil *et al.*, 2011

Martínez-Gil, L., Saurí, A., Martí-Renom, M.A., Mingarro, I.: Membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *FEBS J*. 2011, 278(20), S.3846–3858. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08185.x.

Martoglio *et al.*, 1995

Martoglio, B., Hofmann, M.W., Brunner, J., Dobberstein, B.: The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell*. 1995, 81(2), S.207-14.

Ménétret *et al.*, 2005

Ménétret, J.F., Hegde, R.S., Heinrich, S.U., Chandramouli, P., Ludtke, S.J., Rapoport, T.A., Akey, C.W.: Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J Mol Biol*. 2005, 348(2), S.445-57.

Ménétret *et al.*, 2007

Ménétret, J.F., Schaletzky, J., Clemons, W.M. Jr., Osborne, A.R., Skånland, S.S., Denison, C., Gygi, S.P., Kirkpatrick, D.S., Park, E., Ludtke, S.J., Rapoport, T.A., Akey, C.W.: Ribosome binding of a single copy of the SecY complex: implications for protein translocation. *Mol Cell*. 2007, 28(6), S.1083-92.

Ménétret *et al.*, 2008

Ménétret, J.F., Hegde, R.S., Aguiar, M., Gygi, S.P., Park, E., Rapoport, T.A., Akey, C.W.: Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure*. 2008, 16(7), S.1126-37.

Meyer, 2001

Meyer, H.-A.: Hrsg.: Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I: Identifizierung und Charakterisierung evolutionär konservierter Komponenten des Protein-Translokationsapparates im Endoplasmatischen Retikulum. Berlin, 2001 <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/meyer-hellmuth-alexander-2001-05-18/PDF/Meyer.pdf>.

Mitra *et al.*, 2005

Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L. 3rd, Ban, N., Frank, J.: Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*. 2005, 438(7066), S.318-24.

Morgan *et al.*, 2002

Morgan, D.G., Ménétret, J.F., Neuhof, A., Rapoport, T.A., Akey, C.W.: Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17Å resolution. *J Mol Biol*. 2002, 324(4), S.871-86.

Nagasawa *et al.*, 2007

Nagasawa, K., Higashi, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K.: Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep*. 2007, 8(5), S.483-9.

Nicchitta und Blobel, 1990

Nicchitta, C.V., Blobel, G.: Assembly of translocation-competent proteoliposomes from detergent-solubilized rough microsomes. *Cell*. 1990, 60(2), S.259-69.

Nikonov *et al.*, 2002

Nikonov, A.V., Snapp, E., Lippincott-Schwartz, J., Kreibich, G.: Active translocon

complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2002, 158(3), S.497-506.

Nilsson *et al.*, 2003

Nilsson, I., Kelleher, D.J., Miao, Y., Shao, Y., Kreibich, G., Gilmore, R., von Heijne, G., Johnson, A.E.: Photocross-linking of nascent chains to the STT3 subunit of the oligosaccharyltransferase complex. *J Cell Biol.* 2003, 161(4), S.715-25.

Nilsson und von Heijne, 1993

Nilsson, I.M., von Heijne, G.: Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 1993, 268(8), S.5798-801.

Ojakian *et al.*, 1977

Ojakian, G.K., Kreibich, G., Sabatini, D.D.: Mobility of ribosomes bound to microsomal membranes. A freeze-etch and thin-section electron microscope study of the structure and fluidity of the rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1977, 72(3), S.530-51.

Osborne *et al.*, 2005

Osborne, A.R., Rapoport, T.A., van den Berg, B.: Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005, 21, S.529-50.

Osborne und Rapoport, 2007

Osborne, A.R., Rapoport, T.A.: Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell.* 2007, 129(1), S.97-110.

Panzner *et al.*, 1995

Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., Rapoport, T.A.: Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell.* 1995, 81(4), S.561-70.

Park und Rapoport, 2011

Park, E., Rapoport, T.A.: Preserving the membrane barrier for small molecules during bacterial protein translocation. *Nature.* 2011, 473(7346), S.239-42.

Pathak *et al.*, 1995

Pathak, R., Hendrickson, T.L., Imperiali, B.: Sulfhydryl modification of the yeast Wbp1p inhibits oligosaccharyl transferase activity. *Biochemistry.* 1995, 34(13), S.4179-85.

Penczek *et al.*, 1996

Penczek, P.A., Zhu, J., Frank, J.: A common-lines based method for determining

orientations for $N > 3$ particle projections simultaneously. *Ultramicroscopy*. 1996, 63(3-4), S.205-18.

Pettersen *et al.*, 2004

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E.: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004, 25(13), S.1605-12.

Plath *et al.*, 1998

Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., Rapoport, T.A.: Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*. 1998, 94(6), S.795-807.

Pool, 2009

Pool, M.R.: A trans-membrane segment inside the ribosome exit tunnel triggers RAMP4 recruitment to the Sec61p translocase. *J Cell Biol*. 2009, 185(5), S.889-902.

Potter und Nicchitta, 2002

Potter, M.D., Nicchitta, C.V.: Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J Biol Chem*. 2002, 277(26), S.23314-20.

Prinz *et al.*, 2000

Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T.A., Hartmann, E., Kalies, K.U.: Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J*. 2000, 19(8), S.1900-6.

Raden *et al.*, 2000

Raden, D., Song, W., Gilmore, R.: Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *J Cell Biol*. 2000, 150(1), S.53-64.

Raden und Gilmore, 1998

Raden, D., Gilmore, R.: Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. *Mol Biol Cell*. 1998, 9(1), S.117-30.

Radermacher *et al.*, 1987

Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A., Frank, J.: Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *J Microsc*. 1987, 146(Pt 2), S.113-36.

Radermacher, 1988

Radermacher, M.: Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. *J Electron Microsc Tech.* 1988, 9(4), S.359-94.

Rapoport *et al.*, 2004

Rapoport, T.A., Goder, V., Heinrich, S.U., Matlack, K.E.: Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* 2004, 14(10), S.568-75.

Rapoport *et al.*, 1996

Rapoport, T.A., Jungnickel, B., Kutay, U.: Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem.* 1996, 65, S.271-303.

Rehm und Letzl, 2010

Rehm, H., Letzl, T.: Bindungstest. Hrsg.: Springer: Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 6., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 2010 S.56. ISBN 978-3-8274-2312-2.

Roseman, 2003

Roseman, A.M.: Particle finding in electron micrographs using a fast local correlation algorithm. *Ultramicroscopy.* 2003, 94(3-4), S.225-36.

Ruiz-Canada *et al.*, 2009

Ruiz-Canada, C., Kelleher, D.J., Gilmore, R.: Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell.* 2009, 136(2), S.272-83.

Schulz *et al.*, 2009

Schulz, B.L., Stirnimann, C.U., Grimshaw, J.P., Brozzo, M.S., Fritsch, F., Mohorko, E., Capitani, G., Glockshuber, R., Grütter, M.G., Aebi, M.: Oxidoreductase activity of oligosaccharyltransferase subunits Ost3p and Ost6p defines site-specific glycosylation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106(27), S.11061-6.

Schwarz *et al.*, 2005

Schwarz, M., Knauer, R., Lehle, L.: Yeast oligosaccharyltransferase consists of two functionally distinct sub-complexes, specified by either the Ost3p or Ost6p subunit. *FEBS Lett.* 2005, 579(29), S.6564-8.

Shaikh *et al.*, 2008

Shaikh, T.R., Gao, H., Baxter, W.T., Asturias, F.J., Boisset, N., Leith, A., Frank, J.: SPIDER

image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nat Protoc.* 2008, 3(12), S.1941-74.

Shibatani *et al.*, 2005

Shibatani, T., David, L.L., McCormack, A.L., Frueh, K., Skach, W.R.: Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry.* 2005, 44(16), S.5982-92.

Simon und Blobel, 1991

Simon, S.M., Blobel, G.: A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1991, 65(3), S.371-80.

Simon und Blobel, 1992

Simon, S.M., Blobel, G.: Signal peptides open protein-conducting channels in *E. coli*. *Cell.* 1992, 69(4), S.677-84.

Singer *et al.*, 1987

Singer, S.J., Maher, P.A., Yaffe, M.P.: On the transfer of integral proteins into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84(7), S.1960-4.

Singer *et al.*, 2010

Singer, A., Coifman, R.R., Sigworth, FJ, Chester, D.W., Shkolnisky, Y.: Detecting consistent common lines in cryo-EM by voting. *J Struct Biol.* 2010, 169(3), S.312-22.

Spahn *et al.*, 2001

Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., Frank, J.: Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell.* 2001, 107(3), S.373-86.

Spirig *et al.*, 2005

Spirig, U., Bodmer, D., Wacker, M., Burda, P., Aebi, M.: The 3.4-kDa Ost4 protein is required for the assembly of two distinct oligosaccharyltransferase complexes in yeast. *Glycobiology.* 2005, 15(12), S.1396-406.

Stagljär, 2003

Stagljär, I.: Finding partners: emerging protein interaction technologies applied to signaling networks. *Sci STKE.* 2003, 2003(213):pe56, S.1-5.

Steitz, 2010

Steitz, T.A.: From the Structure and Function of The Ribosome to New Antibiotics.

Hrsg.: The Nobel Foundation: Les Prix Nobel. Band 2009, Stockholm, 2010
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2009/steitz_lecture.pdf.

Steven und Belnap, 2005

Steven, A., Belnap, D.: Electron Microscopy and Image Processing: An Essential Tool for Structural Analysis of Macromolecules. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc., 2005 S.17.2.1–17.2.39. DOI: 10.1002/0471140864.ps1702s42.

Stirling *et al.*, 1992

Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., Schekman, R.: Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell. 1992, 3(2), S.129-42.

te Heesen *et al.*, 1992

te Heesen, S., Janetzky, B., Lehle, L., Aebi, M.: The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity *in vivo* and *in vitro*. EMBO J. 1992, 11(6), S.2071-5.

Trabuco *et al.*, 2008

Trabuco, L.G., Villa, E., Mitra, K., Frank, J., Schulten, K.: Flexible Fitting of Atomic Structures into Electron Microscopy. Structure. 2008, 16(5), S.673-83.

Tsukazaki *et al.*, 2008

Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D.G., Ito, K., Nureki, O.: Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. Nature. 2008, 455(7215), S.988-91.

Tyedmers *et al.*, 2003

Tyedmers, J., Lerner, M., Wiedmann, M., Volkmer, J., Zimmermann, R.: Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. EMBO Rep. 2003, 4(5), S.505-10.

van den Berg *et al.*, 2004

van den Berg, B., Clemons, W.M. Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., Rapoport, T.A.: X-ray structure of a protein-conducting channel. Nature. 2004, 427(6969), S.36-44.

van Heel *et al.*, 1997

van Heel, M., Orlova, E.V., Harauz, G., Stark, H., Dube, P., Zemlin, F., Schatz, M.: Angular Reconstitution in Three-Dimensional Electron Microscopy: Historical and Theoretical Aspects. Scanning Microscopy. 1997, Vol. 11, S.195-210.

van Heel *et al.*, 2000

van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E.V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M., Patwardhan, A.: Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q Rev Biophys.* 2000, 33(4), S.307-69.

van Heel, 1987

van Heel, M.: Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy.* 1987, 21(2), S.111-23.

von Heijne und Blomberg, 1979

von Heijne, G., Blomberg, C.: Trans-membrane translocation of proteins. The direct transfer model. *Eur J Biochem.* 1979, 97(1), S.175-81.

Wagenknecht *et al.*, 1988

Wagenknecht, T., Grassucci, R., Frank, J.: Electron microscopy and computer image averaging of ice-embedded large ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1988, 199(1), S.137-47.

Wang und Dobberstein, 1999

Wang, L., Dobberstein, B.: Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 1999, 457(3), S.316-22.

Watson und Crick, 1953

Watson, J.D., Crick, F.H.: Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953, 171(4356), S.737-8.

Weerapana und Imperiali, 2006

Weerapana, E., Imperiali, B.: Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology.* 2006, 16(6), S.91R-101R.

Whitley *et al.*, 1996

Whitley, P., Nilsson, I.M., von Heijne, G.: A nascent secretory protein may traverse the ribosome/endoplasmic reticulum translocase complex as an extended chain. *J Biol Chem.* 1996, 271(11), S.6241-4.

Wilson *et al.*, 2005

Wilson, C.M., Kraft, C., Duggan, C., Ismail, N., Crawshaw, S.G., High, S.: Ribophorin I associates with a subset of membrane proteins after their integration at the sec61 translocon. *J Biol Chem.* 2005, 280(6), S.4195-206.

Wilson und High, 2007

Wilson, C.M., High, S.: Ribophorin I acts as a substrate-specific facilitator of N-glycosylation. *J Cell Sci.* 2007, 120(Pt 4), S.648-57.

Wriggers und Chacón, 2001

Wriggers, W., Chacón, P.: Modeling tricks and fitting techniques for multiresolution structures. *Structure.* 2001, 9(9), S.779-88.

Yahr und Wickner, 2000

Yahr, T.L., Wickner, W.T.: Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J.* 2000, 19(16), S.4393-401.

Yamaguchi *et al.*, 1999

Yamaguchi, A., Hori, O., Stern, D.M., Hartmann, E., Ogawa, S., Tohyama, M.: Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol.* 1999, 147(6), S.1195-204.

Yan *et al.*, 2003

Yan, A., Ahmed, E., Yan, Q., Lennarz, W.J.: New findings on interactions among the yeast oligosaccharyl transferase subunits using a chemical cross-linker. *J Biol Chem.* 2003, 278(35), S.33078-87.

Yan *et al.*, 2005

Yan, A., Wu, E., Lennarz, W.J.: Studies of yeast oligosaccharyl transferase subunits using the split-ubiquitin system: topological features and *in vivo* interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102(20), S.7121-6.

Yan und Lennarz (JBC), 2002

Yan, Q., Lennarz, W.J.: Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process. *J Biol Chem.* 2002, 277(49), S.47692-700.

Yan und Lennarz (PNAS), 2002

Yan, Q., Lennarz, W.J.: Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits: a glycosylatable photoprobe binds to the luminal domain of Ost1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(25), S.15994-9.

Yan und Lennarz, 2005

Yan, A., Lennarz, W.J.: Two oligosaccharyl transferase complexes exist in yeast and associate with two different translocons. *Glycobiology.* 2005, 15(12), S.1407-15.

Yu *et al.*, 1990

Yu, Y.H., Sabatini, D.D., Kreibich, G.: Antiribophorin antibodies inhibit the targeting to the ER membrane of ribosomes containing nascent secretory polypeptides. *J Cell Biol.* 1990, 111(4), S.1335-42.

Zhou, 2008

Zhou, Z.H.: Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol.* 2008, 18(2), S.218-28.

Zimmer *et al.*, 2008

Zimmer, J., Nam, Y., Rapoport, T.A.: Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature.* 2008, 455(7215), S.936-43.

Zubkov *et al.*, 2004

Zubkov, S., Lennarz, W.J., Mohanty, S.: Structural basis for the function of a minimembrane protein subunit of yeast oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(11), S.3821-6.

Zufferey *et al.*, 1995

Zufferey, R., Knauer, R., Burda, P., Stagljar, I., te Heesen, S., Lehle, L., Aepli, M.: STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*. *EMBO J.* 1995, 14(20), S.4949-60.